



Université de Montréal

Identification des mécanismes périphériques impliqués dans la douleur  
chronique expérimentale des muscles de la mastication

par

Renato Alves Ferreira

Département de Stomatologie

Faculté de médecine dentaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine dentaire

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en sciences buccodentaires

© *Renato Alves Ferreira, 2010*

Université de Montréal

Faculté de médecine dentaire

Ce mémoire intitulé :

Identification des mécanismes périphériques impliqués dans la douleur  
chronique expérimentale des muscles de la mastication

présenté par :

Renato Alves Ferreira

a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Gilles Lavigne

président-rapporteur

Arlette Kolta

directrice de recherche

Réjean Couture.

membre du jury

## Résumé

L'objectif premier de notre projet était d'établir un modèle animal de douleur chronique orofaciale, lequel pourrait imiter la sensibilité retrouvée chez les patients souffrant de douleur orofaciale myalgique. Nous avons procédé à des injections intramusculaires de saline acide (2 injections à 2 jours d'intervalle pH 4.0) pour induire une sensibilisation mécanique des muscles massétéris. La réponse nocifensive a été mesurée à l'aide de filaments de von Frey avant et après ces injections dans des rats Sprague-Dawley. Par la suite, le potentiel analgésique de différents antagonistes des récepteurs glutamatergiques fût évalué par l'injection intramusculaire de ces antagonistes à différents moments.

Nos résultats suggèrent que deux injections de saline acide, produisent une hypersensibilité mécanique signalée par l'augmentation du nombre de réponses à l'application de filaments de von Frey. Cet effet dure plusieurs semaines et est bilatéral, même lorsque les injections sont unilatérales, indiquant qu'une composante centrale est forcément impliquée. Toutefois, une composante périphérique impliquant les récepteurs glutamatergiques semble présider le tout puisque les antagonistes glutamatergiques, appliqués de façon préventive empêchent le développement de l'hypersensibilité. Cependant, le maintien de cette hypersensibilité doit dépendre de mécanismes centraux puisque l'application d'antagonistes une fois la sensibilisation induite, ne diminue en rien le nombre de réponses obtenues.

Ce modèle semble approprié pour reproduire une hypersensibilité musculaire durable de bas niveau. Nos données indiquent que les récepteurs glutamatergiques périphériques participent à l'induction de cette hypersensibilité de longue durée.

Nous croyons que ce modèle pourra éventuellement contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine des myalgies faciales persistantes.

**Mots Clés :** Récepteurs glutamatergiques, fuseau neuromusculaire, saline acide, DNQX, APV, MPEP, MCPG, afférences de gros calibre, nociception et douleur.

## **Abstract**

The first objective of this project was to establish an animal model of chronic orofacial pain, which could mimic symptoms of patients suffering from orofacial myalgia. We used acidic saline injections (2 injections, 2 days apart at pH 4.0) in masseteric muscles to induce mechanical hypersensitivity. Nocifensive behavior was measured before and after the injections using von Frey filaments in male Sprague Dawley rats. Later, the potential analgesic effect of glutamate receptors antagonists was measured by intramuscular administration of these antagonists at different times.

Our results suggest that two injections of acidic saline produce a mechanical hypersensitivity as reflected by the increased number of responses to applications of von Frey filaments. This effect lasts several weeks and is bilateral, even when the injections are unilateral, indicating that a central component must be involved. However, the initial stage of induction of this hypersensitivity involves peripheral glutamate receptors since injection of their antagonists before the second acidic saline injection prevents development of the nocifensive response, whereas their injection at later times is ineffective in blocking development of the response.

This model based on a double injection of acidic saline seems appropriate to reproduce low intensity, long-lasting muscle pain. Our data

suggests that peripheral glutamate receptors are involved in the induction of this long-term hypersensitivity.

We believe that this model may contribute to a better understanding of the mechanisms behind persistent orofacial muscle pain.

**Keywords:** glutamate receptors, muscle spindle, acidic saline, DNQX, APV, MPEP, MCPG, large caliber afferents, nociception and pain.

## Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>xii</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xvi</b>
<b>Chapitre I : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Mise en contexte .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Douleur – (Généralités) .....</b>	<b>7</b>
2.1. Voies nociceptives .....	9
<b>3. Les modèles animaux .....</b>	<b>11</b>
3.1. Modèles de douleur neuropathiques .....	11
3.2. Modèles de douleur inflammatoires .....	13



3.3. Modèles de douleur musculaire et articulaire .....	15
3.4. Évaluation des signes de changement du seuil de la perception mécanique dans les modèles animaux .....	17
<b>4. Douleur pathologique .....</b>	<b>19</b>
4.1. Douleur neuropathique .....	20
4.1.1. Les afférences primaires de petit calibre et les mécanismes de la douleur .....	22
4.1.2. Les afférences de gros calibre et la douleur .....	23
4.2. La douleur musculaire .....	26
4.2.1. Le glutamate et la douleur .....	28
4.2.2. L'expression du glutamate et les fuseaux .....	31
<b>5. Hypothèse et objectifs de l'étude .....</b>	<b>32</b>
 <b>Chapitre II : MATÉRIEL ET MÉTHODE .....</b>	 <b>34</b>
<b>1. Mise en contexte .....</b>	<b>35</b>
<b>2. Substances et solution .....</b>	<b>36</b>
<b>3. Protocoles des injections .....</b>	<b>37</b>

<b>4.</b>	<b>Mesure des seuils .....</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>Les analyses statistiques .....</b>	<b>42</b>
 <b>Chapitre III : RÉSULTATS .....</b>		<b>43</b>
<b>1.</b>	<b>Résultats généraux .....</b>	<b>44</b>
<b>2.</b>	<b>Effet du site d'injection et du type de solution utilisé .....</b>	<b>45</b>
2.1.	Protocole 1 : Effet de la solution saline acide tamponnée injectée unilatéralement .....	45
2.2.	Protocole 2 : Effet du côté injecté .....	47
2.3.	Protocole 3 : Effet du tamponnage des solutions .....	48
<b>3.</b>	<b>Les récepteurs glutamatergiques et la nociception .....</b>	<b>49</b>
3.1.	Protocole 4 : Effet des antagonistes glutaminergiques administrés avant ou après la seconde injection .....	49
3.2.	Protocole 5 : Effets des antagonistes directement incorporés à la solution saline acide .....	52
3.3.	Protocole 6 : Effets des antagonistes injectés entre les deux injections de solution saline acide .....	54
3.4.	Protocole 7 : Efficacité curative des antagonistes .....	56

3.5	Comparaison entre le traitement préventif et curatif .....	58
<b>Chapitre IV :DISCUSSION .....</b>		<b>60</b>
<b>Discussion .....</b>		<b>61</b>
<b>Chapitre 5 : CONCLUSION .....</b>		<b>73</b>
<b>Conclusion .....</b>		<b>74</b>
<b>Bibliographie .....</b>		<b>75</b>

**Liste des tableaux**

Tableau 1 : Effets des différents protocoles utilisés sur la sensibilité mécanique des muscles masséters.....	44
---	----

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Illustration des mécanismes hypothétiques mis-en-jeu dans le développement de l'hypersensibilité mécanique observée dans le modèle de douleur chronique utilisé.....	6
<b>Figure 2:</b> Ensemble des protocoles réalisés.....	39
<b>Figure 3 :</b> Effets de la saline acide injectée unilatéralement.....	47
<b>Figure 4 :</b> Effets des injections de la saline acide injectée bilatéralement.....	48
<b>Figure 5 :</b> Comparaison des effets de différents pH des solutions injectées .....	49
<b>Figure 6:</b> Effets des antagonistes glutamatergiques administrés avant ou après la seconde injection de SA.....	51
<b>Figure 7 :</b> Effet de l'incorporation des antagonistes glutamatergiques directement dans la solution de SA utilisée pour la deuxième injection .....	53
<b>Figure 8 :</b> Effets de l'injection des antagonistes glutamatergiques entre les deux injections de SA .....	55
<b>Figure 9 :</b> Effets de l'injection des antagonistes glutamatergiques deux jours après la seconde injection de SA .....	57

<b>Figure 10 :</b> Comparaison entre les traitements préventif et curatif des protocoles 6 (Fig. 8A, 8B et 8C) et 7 (Fig. 9A, 9 B et 9C).....	59
--	----

## Liste des abréviations et symboles

**AI-SA(t)** = Solution saline tamponnée de pH 4.0 contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropes (DNQX/APV)

**AI-SN(t)-A** = Solution saline tamponnée de pH 7.2, réajustée à 7.2 après l'ajout des drogues, contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropes (DNQX/APV)

**AI-SN(t)-NA** = Solution saline tamponnée de pH 7.2, non-réajustée après l'ajout des drogues et dont le pH final était entre 6.4 et 6.7, contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropes (DNQX/APV)

**AINS** = anti-inflammatoires non-stéroïdiens

**AM-SA** = Solution saline tamponnée de pH 4.0 contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques métabotropes (MPEP/MCPG)

**AM-SN(t)** = Solution saline tamponnée de pH 7.2, réajustée à 7.2 après l'ajout des drogues, contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques métabotropiques (MPEP/MCPG)

**AMPA** =  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate

**APV** = acide 2-amino-5-phosphonovalérique

**ATM** = articulation temporo-mandibulaire

**CCA** = cortex cingulé antérieur

**CPF** = cortex prefrontal

**CPFDL** = cortex prefrontal dorsolatéral

**CFA** = *complete Freund's adjuvant*

**CI** = cortex insulaire

**CGRP** = *calcitonin gene-related peptide*

**DNQX** = 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione

**DOMS** = *delayed onset muscle soreness*

**DTM** = dysfonction temporo-mandibulaire

**FM** = fibromyalgie

**FMRI** = imagerie fonctionnelle par résonance magnétique

**FVF** = filament de von Frey

**HCl** = acide chlorhydrique

**IASP** = *International Association for the Study of Pain*

**IM** = intramusculaire

**L5** = lombaire 5

**L6** = lombaire 6

**MesV** = noyau mésencéphalique du trijumeau



**mGluR5** = *metabotropic glutamate receptor 5*

**MK801** = (+)-5-methyl-10,11- dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate

**MCPG** =  $\alpha$ -méthyl-4-carboxyphénylglycine

**MPEP** = 2-méthyl-6-phényléthynyl-pyridine

**n** = nombre d'animaux

**NaCl** = chlorure de sodium

**NFA** = *National Fibromyalgia Association*

**NGF** = *nerve growth factor*

**NMDA** = acide N-méthyl-D-aspartique

**PBS** = *phosphate buffered saline*

**PPT** = seuil de pression-douleur

**RVM** = région médullaire rostro-ventro-mediane

**SA (t)** = Solution saline tamponnée de pH 4.0

**SA (nt)** = Solution saline non-tamponnée de pH 4.0

**SN (t)** = Solution saline tamponnée de pH 7.2

**SN-NA(nt)** = Solution saline non-tamponnée de pH 7.2, non réajustée de pH final 5.8.

**SNC** = système nerveux central

**SI** = cortex somatosensoriel primaire

**S2** = cortex somatosensoriel secondaire

**SP** = substance P

**VGLUT1** = vésicule de transporteur de glutamate

**VIH** = virus de l'immunodéficience humaine

**VPL** = complexe ventrobasal postéro-latéral

**VPM** = complexe ventrobasal postéro-médian

**5-HT** = sérotonine

## Remerciements

Aux Drs Arlette Kolta et James Lund (*in memoriam*) pour avoir cru en moi, m'avoir accompagné et soutenu. Sans vous, je ne serais certainement pas où je suis ni si heureux d'y être.

À François Auclair, Danielle Veilleux, Isabel Arseneault, Dr Nadia Caram et à tous mes compagnons des laboratoires Dubuc et Kolta, lesquels m'ont soutenu pendant mon deuxième cycle, soit dans des tâches linguistiques, scientifiques, culturelles...

Merci à vous tous.

## **Chapitre 1**

### **INTRODUCTION**

## **1. Mise en contexte**

La douleur est : « Une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrite en des termes évoquant de telles lésions » (IASP) (1). Cliniquement, elle peut être classée comme aiguë ou chronique. Les cas les plus intrigants sont les cas de douleur chronique dont les traitements peuvent être très variés. Ils sont toujours peu précis et souvent trouvés par tâtonnements. La complexité des traitements des douleurs chroniques est due à l'aspect multidimensionnel de la nociception qui comporte des composantes sensorielle, affective-émotionnelle, cognitive et comportementale.

Une autre considération de la douleur chronique est l'aspect négatif sur la qualité de vie de la population. Ce genre de malaise mène souvent à l'incapacité ou à la difficulté de réaliser des tâches au travail ou même à la maison, la diminution des contacts sociaux, la privation de certaines nourritures et des troubles de sommeil (2). De tels changements produisent à leur tour une suite d'irritabilité, d'anxiété et de stress chez les personnes souffrant de douleurs persistantes.

Les douleurs chroniques peuvent avoir différentes causes qu'il s'agisse de migraines, de douleur post-opératoire, de fibromyalgie, de syndromes temporo-mandibulaires ou de la douleur neuropathique comme chez les diabétiques ou à la suite de lésions nerveuses.

En tant que problème de santé publique, il est impératif de trouver des moyens plus efficaces pour la prévention ou le soulagement des douleurs chroniques, puisque leurs coûts de traitement sont très onéreux (3) et leur incidence grimpe de plus en plus au Canada (2) comme partout dans le monde. Selon Lipton et coll., 7 % de la population américaine vit, ou a déjà vécu, au moins une expérience de douleur chronique orofaciale par année, dont les incidences les plus fréquentes sont les désordres temporo-mandibulaires (TMD) (4) ayant ou non une composante myalgique localisée (5) ou diffuse (6).

Nous nous sommes donc demandés quelle était l'origine de cette composante myalgique. Des changements dans le phénotype des afférences sensorielles de gros calibre ont été décrites dans les cas de douleurs neuropathiques (7-10), mais leur rôle dans les mécanismes du déclenchement et du maintien de la myalgie chronique est relativement peu connu. Nous nous sommes donc attardés sur cette question.

Pour mieux comprendre les phénomènes myalgiques faciaux, nous avons proposé un modèle de douleur chronique des muscles de la face chez les rongeurs, en nous basant sur les études de Sluka (11, 12) .

Sluka et coll. ont établi un modèle de douleur chronique chez les rats en injectant des solutions salines acides dans les muscles gastrocnémiens (11, 12). En revanche, nous avons choisi de réaliser nos tests sur la face des animaux, plus précisément sur le muscle masséter dans lequel nous injectons un petit

volume, d'environ 100  $\mu$ l, de solution saline acide (pH 4,0) de façon répétée (deux fois à deux jours d'intervalle). Les muscles masséters ont été choisis parce que leurs afférences fusoriales de gros calibre ont leur corps cellulaire dans le noyau mésencéphalique du trijumeau (MesV) dans le tronc cérébral (13, 14). Elles peuvent donc être facilement identifiées et ciblées pour les enregistrements électrophysiologiques.

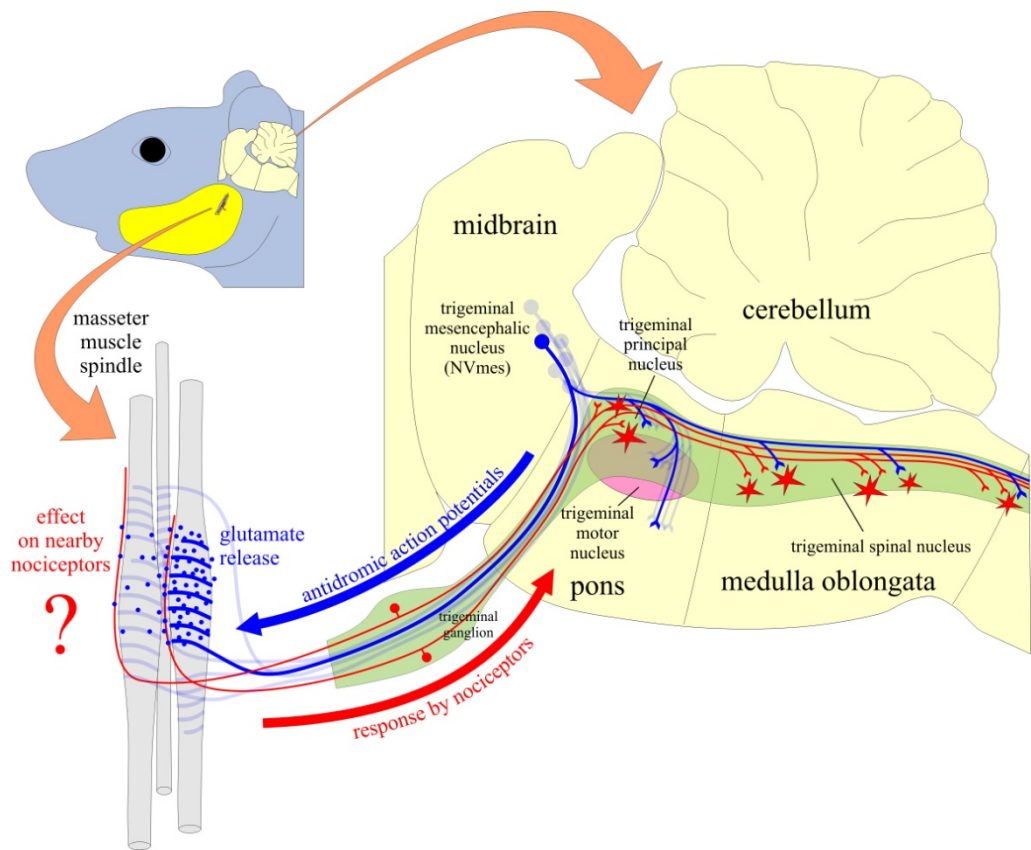
Au cours des études précédentes dans notre laboratoire (15), nous avons établi que de telles injections unilatérales produisent des changements dans le comportement nocifensif de rats de façon persistante et bilatérale durant environ deux semaines. Ce comportement aversif reflète une hypersensibilité mécanique du muscle et pourrait être associé à la douleur. Les changements comportementaux, dont la durée peut s'étendre jusqu'à un mois, lorsque les injections sont bilatérales ne sont pas observés chez les rats témoins injectés avec une solution saline neutre (pH 7,2). Des études électrophysiologiques, menées dans notre laboratoire, ont démontré que ces changements comportementaux s'accompagnent également de changements dans les propriétés électrophysiologiques des corps cellulaires des neurones du noyau mésencéphalique du trijumeau (MesV) qui innervent les afférences fusoriales des muscles masséters (15). Le potentiel membranaire des neurones du MesV de rats ayant reçu des injections de solution saline acide était plus hyperpolarisé que celui des neurones contrôles. Ceci s'est avéré aussi être le cas pour des mesures telles que le seuil des potentiels d'action, les oscillations

membranaires, le seuil pour les décharges en bouffées et les rectifications entrante et sortante. Toutes ces valeurs étaient plus hyperpolarisées. L'amplitude des oscillations membranaires était augmentée et des décharges spontanées ont été observées dans environ 10% des neurones exposés au traitement avec les injections acides, mais jamais dans les neurones sous conditions contrôles. Ces données ont donné naissance à l'hypothèse illustrée dans la figure 1, selon laquelle l'hyperexcitabilité des afférences fusoriales des muscles masséters pourrait se traduire par une décharge antidromique causant une libération de neurotransmetteurs en périphérie activant ainsi les nocicepteurs adjacent.

Nos études en immunohistochimie ont effectivement montré que les fibres annulo-spiralées des fuseaux des muscles orofaciaux chez les rats présentent des vésicules de transporteurs de glutamate (VGLUT1) tel qu'avait été démontré par Pang et coll. (16), suggérant que ces vésicules peuvent relâcher du glutamate. Ces études ont également mis en évidence que de petites fibres positivement marquées par les marqueurs de fibres nociceptives et portant des récepteurs glutaminergiques se trouvaient à l'intérieur de la capsule fusoriale à proximité des fibres annulo-spiralées pouvant libérer du glutamate.

Si notre hypothèse est exacte, l'injection locale d'antagonistes des récepteurs des divers neurotransmetteurs pouvant être libérés par les afférences fusoriales pourrait prévenir ou même bloquer le développement de la douleur chronique dans notre modèle expérimental chez les rats.





**Figure 2:** Illustration des mécanismes hypothétiques mis-en-jeu dans le développement de l'hyperexcitabilité mécanique observée dans le modèle de douleur chronique utilisé. Une hyperexcitabilité, des corps cellulaires des neurones du MesV pourrait induire une décharge de potentiels d'actions qui pourraient se propager de façon antidromique et causer une libération de glutamate en périphérie. Le glutamate ainsi libéré pourrait diffuser et activer les terminaisons de nocicepteurs s'il s'en trouve à proximité.

## 2. **Douleur** – (Généralités)

La douleur est un phénomène complexe qui affecte les aspects physique et émotionnel humains.

La douleur est une sensation protectrice, mais elle peut aussi être un fardeau sans utilité. La douleur, comme un ami, prévient des dommages imminents et protège le corps contre les blessures. Par contre, comme un ennemi, elle est une sensation qui peut aggraver le problème sous-jacent et peut devenir une maladie à part entière (17).

La signification de la perception de la douleur est subjective et non innée. Son apprentissage se passe pendant la petite enfance avec nos expériences de lésions et de blessures, ce que lui confère une composante négative et désagréable. Sa quantification est une tâche assez difficile à réaliser, puisqu'elle est dépendante d'un vécu individuel personnel et non transférable, qui est aussi dépendant de la culture de chaque peuple. Pour la déclencher, il ne faut pas nécessairement de stimuli. La douleur a d'autres déclencheurs que les facteurs physiques et chimiques. Elle peut aussi avoir des déclencheurs psychologiques ou neurologiques. La douleur est donc un état dépendant de la biologie, des aspects psychologiques, des aspects comportementaux et culturels.

La sensation de la douleur nous alerte sur l'imminence ou sur un préjudice réel, donc en conséquence elle participe, elle aussi, aux mécanismes qui donnent naissance à des réponses appropriées à la protection de l'individu.

Les Grecs et les Romains ont été les premiers à théoriser sur la perception de la douleur. Ils ont remarqué un lien entre un stimulus douloureux et le système nerveux central. Aristote a été le premier à établir ce lien. Plus tard, en l'an 1664, le philosophe René Descartes a décrit la voie de la douleur quand il a conçu un schéma représentant son parcours du stimulus au cerveau.

Le XIX<sup>e</sup> siècle a été témoin d'une grande avancée dans le traitement de la douleur avec la découverte de l'usage de l'opium, de la morphine et de la cocaïne pour soulager les gens souffrant de douleur. Plus récemment, la découverte de l'aspirine et d'autres molécules comme les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) classiques et les coxibes, l'acétaminophène, les antidépresseurs tricycliques, les anticonvulsivantes, les anti-NMDA, ainsi que le perfectionnement des techniques utilisant des analgésiques injectables ont amené les traitements de la douleur à un niveau beaucoup plus élevé et précis.

Aujourd'hui, il est connu qu'une série de mécanismes endogènes influence l'expérience de la douleur chez l'homme et varie selon la personne affectée. Ces mécanismes, excitateurs ou inhibiteurs, combinés aux autres composantes de la perception de la douleur, rendent bien compte de la complexité de la douleur.

Pour mieux comprendre les mécanismes de la douleur, il est nécessaire d'être conscient de l'existence des aspects psychologiques et culturels de la douleur, mais il faut surtout connaître ses aspects neurophysiologiques et leurs voies.

## **2.1. Voies Nociceptives**

La nociception commence d'abord par la détection d'un stimulus qui est codé en signal électrique et qui est ensuite acheminé par les fibres nerveuses sensorielles périphériques vers le système nerveux central. De tels stimuli de nature chimique, thermique, mécanique ou différentes combinaisons d'entre eux sont conduits, après leur codification, vers les cornes postérieures de la moelle épinière, par les neurones primaires, où se retrouve la première synapse. Le neurone secondaire, qui reçoit alors le signal, voyage dans la moelle et donne origine à la voie spinothalamique qui monte vers les régions des complexes ventrobasal et centromédian du thalamus somatosensoriel où il fait synapse avec les neurones tertiaires. Cette troisième série de neurones conduit les informations nociceptives vers différentes régions du cortex somatosensoriel et à certaines structures limbiques. Les neurones secondaires font aussi synapse dans différentes régions du tronc cérébral tel que la substance grise périaqueducale et les noyaux du raphé dont les signaux, d'origine périphérique, subissent des modulations. De plus, les signaux nociceptifs subissent des influences excitatrices et/ou inhibitrices pendant tout leur chemin de la périphérie vers les centres plus hauts.

Plusieurs voies ascendantes acheminent l'information sensorielle nociceptive aux centres supraspinaux. Les deux plus importantes de ces voies sont: la voie spinothalamique et la voie spinoréticulaire. La première formée du faisceau spinothalamique latéral projette vers les noyaux thalamiques latéraux

du complexe ventrobasal postéro-latéral (VPL) et postéro-médian (VPM). La seconde est formée du faisceau spinoréticulaire dont la majorité des afférences projettent vers les noyaux médians du thalamus. Une partie des fibres ascendant dans ce faisceau et issues des couches I et IV-V des cornes postérieures de la moelle épinière forme la voie spino-ponto-mésencéphalique projetant à certaines structures du tronc cérébral, dont la substance grise périaqueducale et les noyaux du raphé. De plus, des fibres issues de la couche I montent aussi dans le cordon dorsolatéral pour se terminer dans la région parabrachiale. Ces deux derniers contingents jouent, supposément, un rôle dans la mise en jeu des contrôles inhibiteurs descendants de la transmission nociceptive spinale, ainsi que dans les aspects émotionnels et affectifs de la douleur (18)

Le but des signaux nociceptifs est d'atteindre les aires du cortex cérébral, plus précisément quatre structures : le cortex somatosensoriel primaire (SI), le cortex somatosensoriel secondaire (S2), le cortex cingulé antérieur (CCA) et le lobe du cortex insulaire (CI). S1 et S2 sont plus impliqués dans la discrimination sensorielle de la douleur, tandis que , alors que le CCA et le CI sont plus associés à la composante motivo-affective de la douleur (19).

De plus, des études d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) chez l'homme suggèrent que le cortex frontal médian et le cervelet soient associés à l'anticipation de la douleur; que le CCA dorsal et le cortex préfrontal dorsolatéral CPFDL soient associés à l'attention que l'individu donne à la douleur et que le claustrum, une région fortement reliée à

l'amygdale, soit lié aux aspects émotionnels de la douleur (20). L'auteur de cette étude suggère que le cortex préfrontal CPF agisse comme un centre de contrôle de la douleur, puisqu'une augmentation a été observée dans l'activité de cette région parallèlement à une baisse de la sensibilité douloureuse.

Une autre étude d'IRMf suggère que des aires comme le CCA, et fort probablement une partie de l'insula, jouent un rôle dans la dimension affective dans les processus nociceptifs. De plus, il est suggéré dans cette même étude qu'en conditions normales chez des individus sains, le cortex insulaire ainsi que le CCA, S1 et S2 soient activés de façon directement proportionnelle à l'intensité du stimulus perçue par l'individu (21)

### **3. Les modèles animaux**

Des modèles animaux sont nécessaires pour l'étude de la douleur. Mais pour que ces modèles soient valides, ils doivent au moins reproduire le malaise étudié. En plus de contribuer à l'élucidation des mécanismes physiologiques et pathophysiologiques de la douleur, de tels modèles permettent aussi de faire l'essai de nouvelles approches thérapeutiques.

#### **3.1. Modèles de douleur neuropathique**

Le terme «douleur neuropathique» réfère à la douleur qui provient d'une pathologie qui cible le système nerveux. Parmi ces conditions, citons le

diabète, le zona, les réactions associées à une compression d'un nerf, un traumatisme d'un nerf, les "canalopathies" et les maladies auto-immunes (22) .

Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour l'étude de la douleur (23-33).

Dans le modèle de Bennett et Xie, des ligatures légèrement constrictives sont placées autour du nerf sciatique pour produire une douleur neuropathique chez le rat. Ce modèle présente de l'hyperalgésie à la chaleur radiante et aux stimuli chimiques, de l'allodynie à la stimulation mécanique et de la douleur spontanée (32).

Le modèle de Seltzer et coll. repose sur un dommage partiel du nerf sciatique. Il produit une douleur chronique où supposément la douleur spontanée est présente, puisque les rats ont une tendance à se protéger la patte atteinte par la chirurgie. Dans ce modèle, les animaux présentent une diminution du seuil nociceptif dans le test avec les filaments de von Frey, ce qui est un signal caractéristique de l'hyperalgésie (24) .

Kim et Chung ont développé un modèle de douleur neuropathique périphérique avec ligature légère des nerfs spinaux L5 et L6 ou seulement L5. Leurs résultats avec les FVF suggèrent que ce genre de manipulation cause de l'allodynie sur la patte innervée par le nerf ligaturé (27) .

Decosterd et Woolf ont développé une variante pour la technique du dommage du nerf sciatique. Ils endommageaient seulement deux ou trois

petites branches du nerf sciatique comme le tibial et le peroneal en laissant le sural intact. Cette procédure permettait de tester la sensibilité de la peau autour des petites régions dénervées plus efficacement tout en ayant moins d'effets douloureux généralisés sur les animaux que les techniques de Bennett et de Kim. De plus, dans la technique de Decosterd et Woolf, les résultats des tests d'hypersensibilité reviennent au niveau de base entre sept et neuf semaines. Ce qui n'est pas le cas avec les autres techniques chirurgicales plus agressives comme celles de Bennett, où l'hypersensibilité peut se prolonger jusqu'à six mois après chirurgie (31) .

### **3.2. Modèles de douleur inflammatoires**

Les douleurs inflammatoires résultent souvent de la libération de divers facteurs qui forment ce que l'on appelle « la soupe inflammatoire » (la bradykinine, la prostaglandine, l'histamine, la sérotonine, les cytokines pro-inflammatoires, la substance P, ... etc.) qui sensibiliserait les nocicepteurs. Un exemple de cette sensibilisation est quand la bradykinine ou les prostaglandines se lient aux récepteurs couplés aux protéines G et induisent l'activation des protéines kinases A (PKA) et C (PKC) causant une phosphorylation des canaux ioniques et des récepteurs des fibres nociceptives (34). Selon Le Bars et Adam (35) les récepteurs NMDA sont phosphorylés par les PKA, tandis que les récepteurs AMPA/Kaïnate par les PKC. De plus, récemment Peng et coll. (36)



ont suggéré que le récepteur TRPV-1 peut être phosphorylé concomitamment par les PKA et PKC.

Il existe différents modèles expérimentaux de douleurs inflammatoires qui recourent à des méthodes mécanique ou chimique. Dans les méthodes chimiques, des substances inflammatoires sont utilisées afin de produire une douleur persistante. Parmi celles-ci, les plus souvent utilisées sont le «*complete Freund's adjuvant*» (CFA) (37, 38) , la carraghénine (39) et la capsaïcine (40) . Par exemple, le CFA a été utilisé par Ren et Dubner dans les tissus des régions péri-temporo-mandibulaire et péri-orale pour l'induction d'une douleur inflammatoire causant une allodynie pouvant durer jusqu'à deux semaines (41).

D'autres méthodes expérimentales sont parfois utilisées pour induire une douleur inflammatoire, tel que dans l'étude de Kobayashi et coll. (42) où la douleur a été induite à l'aide d'un micro ballon qui augmente la pression intramusculaire dans les muscles paravertébraux des animaux. Les signes d'inflammation apparaissent dès le premier jour suivant la procédure et durent jusqu'à 28 jours après le gonflement du ballon. Selon leurs résultats, l'expression de la SP au niveau du ganglion dorsal augmente de façon significative par rapport au groupe témoin.

### **3.3. Modèles de douleur musculaire et articulaire**

Sluka et coll. (11, 12) ont remarqué le besoin d'un modèle animal pour étudier la douleur musculosquelettique chronique. En sachant que la diminution du pH intratissulaire, telle qu'observée pendant les processus d'inflammation, en présence d'hématomes, et suite aux exercices musculaires isométriques, ont un lien avec la douleur, un modèle de douleur chronique a été proposé (43-45). Il s'agit de deux injections de saline acide (pH 4,0) dans les muscles gastrocnémiens des rats lesquelles permettent de développer une hyperalgésie généralisée chez ces rongeurs pouvant durer jusqu'à quelques semaines. Suite à l'injection de 100 µl de la solution acide, le pH du tissu musculaire diminue de ~7.2 à 6,5 et revient à son niveau de base en sept minutes. Les dommages tissulaires causés par ces injections sont minimes et ne diffèrent pas de ceux produits par l'injection d'une solution saline neutre. De plus, aucun signe d'inflammation n'est observé. Le modèle de Sluka visait à reproduire les symptômes de douleur chronique observés dans les syndromes tels que la fibromyalgie. Dans notre étude par contre, nous avons choisit de procéder aux injections dans les muscles masséters, puisque nous nous intéressons aux myalgies orofaciales.

Une autre approche expérimentale, souvent utilisée pour induire la douleur musculaire aiguë, consiste en l'injection intramusculaire (IM) d'une dose unique de solution saline hypertonique (généralement 5% de NaCl) (46-

49). Chez l'homme, l'administration de cette substance de façon continue mime la douleur musculaire profonde et persistante (50).

Des infusions de solution saline hypertonique dans les masséters chez l'homme produisent d'importantes hypersensibilités dans les structures ipsilatérales à l'administration de la solution qui s'étendraient jusqu'aux dents postérieures supérieures et inférieures, la région du muscle temporal et l'articulation temporo mandibulaire (ATM) (51-56) .

Ro et coll. ont examiné l'effet d'une perfusion continue de solution saline hypertonique (aux taux de 20µl/min pendant 10 minutes) dans le masséter de rats légèrement anesthésiés. Un comportement nocifencif s'exprimant par un mouvement de la patte postérieure essayant de gratter la face fut observé pendant la première minute de perfusion, cependant ce comportement diminua de plus en plus pour devenir minime vers la fin de la perfusion (57) .

Depuis un certain temps le lien entre le pH intramusculaire acide et la douleur musculaire est connu (43, 44, 58, 59). En se basant sur le travaux chez l'homme et chez le rat de Steen et Reeh (60-62), Sluka et coll. ont développé leur modèle de douleur chronique chez les rongeurs basé sur deux injections d'une solution saline acide (pH 4.0), injections séparées par une période de deux à cinq jour (11, 12) . Selon ces auteurs, les dommages causés au muscle par ces injections sont minimes et ne diffèrent pas de ceux observés dans le groupe témoin. Ce modèle a déjà été utilisé dans plusieurs études (63-67) .

### **3.4. Évaluation des signes de changement du seuil de la perception mécanique dans les modèles animaux**

Dans les modèles animaux de douleur, des changements dans le seuil de la perception et du comportement sont observés à la suite des procédures chirurgicales, chimiques ou les deux ensemble (37, 68-74). Ces changements peuvent se traduire par de l'hyperalgésie, de l'allodynie, une perte de sensibilité, une paresthésie, etc. L'allodynie se définit comme une sensibilité douloureuse induite par des stimuli qui dans des conditions normales sont non-douloureux et l'hyperalgésie est une réponse nociceptive accrue par rapport à un stimulus nociceptif donné.

Cependant, l'interprétation de la douleur observée durant les études avec les animaux n'est pas une tâche très simple. Chez l'homme, l'individu testé peut préciser son expérience de douleur. Il peut s'exprimer verbalement ou en utilisant des moyens comme les échelles visuelles et les questionnaires. Par contre, avec l'animal, ce genre de précision n'existe pas. Dans ce cas, il faut décoder les signaux associés à la douleur. Ce qu'on interprète dans de tels cas, ce sont des réponses indicatives d'une expérience déplaisante (75).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer les changements du seuil des réponses à des stimuli mécaniques dans les modèles animaux de douleur. Les plus fréquemment utilisées recourent aux filaments de von Frey (FVF) ou aux pinces.

La méthode développée par Randall et Sellito, il y a plus qu'une cinquantaine d'années, se basait sur l'application d'une pression sur la patte de l'animal placée entre une surface plane et un pointeur contondant, mais pour ce faire il fallait que l'animal soit restreint (76) . Ce qui amenait beaucoup de stress chez l'animal. Des modifications ont été apportées à la méthode de Randall et Sellito pour réduire le stress des animaux. Ainsi, Taiwo et coll. (77) ont montré en 1989 qu'un pré-entraînement des animaux augmentait la sensibilité et la précision de l'expérimentateur pour l'interprétation des réponses hyperalgésiques. De plus, l'entraînement laissait les animaux plus à l'aise avec le manipulateur, ce que minimise les fausses réponses dues au stress.

Ren (41) décrit dans son article « *An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat* » une méthode d'évaluation du changement du seuil nociceptif employant des monofilaments Semmes-Weinstein qui sont un type de FVF. Dans cette méthode, les rats ne sont pas retenus, mais maintenus libres dans une cage avec la face positionnée contre la main gantée de l'expérimentateur. Le test se fait en appliquant le filament sur la joue ou sur le bord de la patte des animaux jusqu'à ce qu'il plie. Le filament est ensuite retiré, ce qui selon lui cause moins de stress aux animaux. Dans cette méthode les filaments sont testés cinq fois sur la joue de l'animal. Les rats étaient considérés comme positifs s'ils réagissaient par un retrait de la tête trois fois sur cinq (41). Cette méthode a été aussi utilisée par d'autres chercheurs (78). Cependant, selon certains auteurs, les méthodes avec les filaments de von Frey

ne sont pas très fiables pour mesurer l'hyperalgésie primaire dans les muscles, mais plutôt pour mesurer l'hyperalgésie secondaire (79, 80). Ceci explique pourquoi Skyba et coll. proposent d'utiliser des pinces pour appliquer une pression sur la région musculaire à être testée (gastrocnémien des rats) jusqu'à que le rat retire sa patte ou qu'il vocalise afin de mesurer l'hyperalgésie primaire (80). Cette méthode a été aussi utilisée par un laboratoire au Japon (79). Par contre, selon Mathews, la vocalisation est un des signes les plus faibles pour l'interprétation de la douleur chez les animaux, puisqu'elle n'a pas vraiment un lien strict avec la douleur (81).

#### **4. Douleur pathologique**

La douleur est dite pathologique lorsqu'elle persiste en absence de raisons protectrices évidentes pour l'organisme. Ces douleurs se développent en présence et aussi en absence de dommage tissulaire, comme celui provoqué par une inflammation (réaction neuronale ou gliale) ou par d'autres genres de stimulation comme un trauma chirurgical, des pathologies lésionnelles persistantes, du zona, d'une neuropathie diabétique ou même de douleurs psychogènes.

Dans le simple but d'illustrer la question du mécanisme de la douleur pathologique inflammatoire, nous citerons un passage du travail de Meunier et coll. « Lors d'une inflammation périphérique, des molécules synthétisées et

libérées dans le foyer inflammatoire, comme les prostaglandines, la bradykinine, la sérotonine, certaines cytokines et le NGF (*nerve growth factor*), agissent directement sur les terminaisons des neurones sensoriels primaires pour les stimuler, les sensibiliser à l'action d'autres molécules, ou encore modifier leur phénotype. C'est ainsi que l'expression de nombreux neuropeptides tels que la substance P (SP) le CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), les peptides opioïdes ou la galanine, est altérée au sein même de ces neurones et/ou dans des neurones spinaux. De plus, la synthèse, le transport et la densité des récepteurs de certaines de ces molécules sont profondément modifiés» (82).

#### **4.1. Douleur neuropathique**

La douleur neuropathique est une douleur causée par une lésion du système nerveux qui est particulièrement problématique parce qu'elle est généralement expérimentée dans des parties du corps qui semblent normales. Elles sont généralement de longues durées, sévères et résistantes à certaines formes d'analgésie. Elles peuvent être originaires d'un dommage qui a affecté le cerveau, la moelle épinière et/ou les nerfs périphériques. Ce genre de douleur peut apparaître chez les patients souffrant de diabète, de cancer, atteints par le VIH, l'herpès, ou ayant subi une lésion de la colonne vertébrale ou souffrant d'une névralgie du trijumeau (83).

Plusieurs mécanismes pathophysiologiques sont liés au développement des douleurs neuropathiques et la place de ces mécanismes n'est pas restreinte seulement au nerf endommagé et aux ganglions dorsaux. Des changements dans les processus d'information sensoriels surviennent aussi au niveau de la moelle épinière (84).

Dans les cas de neuroinflammations, l'environnement résultant de l'endommagement des tissus peut causer l'activation des cellules gliales situées dans la moelle épinière et le cerveau. Cette activation semble jouer un rôle de premier plan dans la nociception, puisque ces cellules gliales jouent un rôle dans la modulation de la neurotransmission au niveau synaptique. La glie est formée par deux catégories principales de cellules: la microglie et la macroglie (astrocytes et oligodendrocytes). Les astrocytes et les microglies sont connus pour jouer un rôle dans le développement, la propagation et la potentialisation de la douleur neuropathique. Après une stimulation nociceptive périphérique via une lésion nerveuse, les microglies deviennent actives et libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale alpha, l'interleukine-1beta, et l'interleukine-6, amorçant ainsi le processus de la douleur. La microglie propage la neuroinflammation par le recrutement de d'autres microglies, et éventuellement par l'activation des astrocytes à proximité, ce qui prolonge l'état inflammatoire et conduit à une condition de douleur neuropathique chronique (85). De plus, selon Woolf et Costigan, dans les cas d'inflammation le processus de transduction de la nociception se passe



aussi dans le complexe glial par les récepteurs P2X3 qui sont trouvés sur ces cellules. (86).

Un autre facteur qui peut s'avérer fort important dans les cas de la nociception est la prédisposition génétique (87). En outre, il a déjà été démontré que les haplotypes LPS (*low pain sensitivity*), APS (*higher pain sensitivity*) et le HPS (*highest pain sensitivity*) sont responsables pour la variabilité de ~11% dans le processus de la perception nociceptive (88), suggérant que la sévérité de la douleur ressentie dépende de facteurs génétiques. Plusieurs variantes génétiques sont reliées à l'expression ou à la fonction du système nocicepteur (89), par conséquent, on pourrait suggérer qu'au niveau cellulaire la nociception est un processus neuro-glial-génétique.

#### **4.1.1. Les afférences primaires de petit calibre et les mécanismes de la douleur**

Les fibres de petit calibre, de type C et A $\delta$ , sont des fibres spécifiques qui ne répondent qu'à des stimuli d'origine mécanique, chimique et thermique dont l'intensité est potentiellement douloureuse.

À la suite d'un dommage tissulaire, plusieurs substances pronociceptives peuvent être relâchées en périphérie (potassium, prostaglandines, bradykinine, histamine, substance P, sérotonine) où elles recruteront les nocicepteurs polymodaux et produiront une sensibilisation locale (90). Mais, la stimulation

répétée des fibres C peut causer une sensibilisation spinale (91) . Alors, le recrutement des fibres C cause la libération d'acides aminés excitateurs, comme le glutamate et l'aspartate, ainsi que des peptides comme le CGRP et la substance P. Ces médiateurs activeront les récepteurs postsynaptiques  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole (AMPA), NMDA et les récepteurs NK-1. La sensibilisation prolongée des récepteurs NMDA active des gènes à expression rapide qui entretiennent une hyperalgésie après la guérison de la blessure (19).

#### **4.1.2. Les afférences de gros calibre et la douleur**

Des lésions sur des tissus nerveux et même de l'inflammation peuvent produire de l'hypersensibilité qui peut se présenter sous forme d'allodynie ou d'hyperalgésie. On parle d'allodynie lorsqu'un stimulus non douloureux devient douloureux et d'hyperalgésie lorsqu'un stimulus douloureux devient plus douloureux et avec une plus longue durée. D'autres cas incluent la paresthésie qui se définit comme un trouble de la sensibilité, désagréable et non douloureux, pouvant s'accompagner d'une anesthésie et la dysesthésie qui est une sensation anormale, désagréable et douloureuse, spontanée ou évoquée. Plusieurs études suggèrent qu'il existe un lien entre l'apparition d'une activité ectopique anormale dans les afférences de gros calibre et le développement de l'hyperalgésie et de l'allodynie dans les modèles animaux de douleur neuropathique (9, 92, 93).

En situation normale, les afférences de gros calibre expriment des oscillations rapides de leur potentiel membranaire même lorsqu'elles sont au repos. Dans certains cas de douleur neuropathique, le dommage des neurones sensoriels primaires cause une augmentation de l'amplitude de ces oscillations qui atteignent alors le seuil de décharge et peuvent faciliter l'apparition de décharges répétées dans ces afférences primaires (94, 95) .

Dans les cas d'inflammation, l'hypersensibilité disparaît dès que le cadre inflammatoire est contrôlé. Par contre, celle reliée à la douleur neuropathique se prolonge même après le contrôle du motif déclenchant. Ce fait peut être expliqué par la plasticité neuronale qui peut mener à des changements à court ou à long terme. Des altérations touchant la phosphorylation des récepteurs et des canaux ioniques peuvent mener à des changements dans l'excitabilité des neurones sensoriels primaires et centraux de façon réversible. Alors que les altérations de la régulation des gènes, de la connectivité et aussi par la mort cellulaire causent des changements à long terme et parfois irréversibles. Une altération à long terme bien décrite est celle qui touche la réorganisation des terminaisons centrales des afférences sensorielles de type A $\beta$ . Des études suggèrent que suite à cette réorganisation, elles font synapses sur les terminaisons de fibres C (connectivité) au niveau de la moelle épinière, ce qui pourrait expliquer la nature non traitable de certaines douleurs neuropathiques (96).

La première indication de l'implication des afférences fusoriales dans le processus de la douleur provient d'études sur la douleur musculaire tardive

(*Delayed Onset Muscle Soroness*, DOMS) post-exercice. Weerakkody et coll.(97) ont comparé les effets d'une forte compression mécanique (stimulus douloureux) seule puis accompagnée par une vibration sur le muscle gastrocnémien sur de sujets sains en utilisant une fréquence optimale pour stimuler les fuseaux musculaires avant et après l'induction de DOMS par l'exercice. Les résultats ont montré que le seuil de pression-douleur (PPT) des muscles non exercés est augmenté par l'application des vibrations sur la compression, ce qui suggère que la stimulation des fuseaux neuromusculaires réduit la douleur. Cependant, la même procédure aggrave la douleur en présence de DOMS et le PPT est augmenté lorsque un blocage préférentiel des fibres est exercé par pression sur le nerf sciatique (98), (97) .

Récemment dans notre laboratoire, le modèle animal de Sluka, établi en 2001, a été adapté aux muscles de la mâchoire pour tester l'effet de l'acidité sur les afférences innervant les fuseaux neuromusculaires chez le rat (15). Les résultats montrent que deux injections de solution saline acide à deux jours d'intervalle dans le muscle masséter, causent des changements dans les propriétés électrophysiologiques des afférences neuromusculaires dès le lendemain de la première injection et durent jusqu'à 35 jours dépendamment du protocole. Le changement électrophysiologique le plus important a été l'hyperpolarisation de tous les paramètres observés : le seuil des potentiels d'action, les oscillations membranaires et les décharges en bouffée. Une nette augmentation de l'amplitude des oscillations a aussi été observée, de même que des décharges spontanées occasionnelles (15). Cependant, il n'est pas clair

comment une activité altérée des afférences fusoriales se traduirait par une activation des voies nociceptives. Étant donné que les potentiels d'action dans les afférences peuvent également se propager de façon antidromique (99, 100), il a été suggéré qu'il puisse y avoir interaction entre les terminaisons des afférences fusoriales et celles des nocicepteurs polymodaux en périphérie. Effectivement, nos récents résultats dans ce domaine ont montré que les fibres de petit calibre immunoréactives aux marqueurs habituellement associés aux nocicepteurs et portant des récepteurs glutamatergiques se trouvent à proximité des terminaisons annulo-spiralées capables de libérer du glutamate dans les fuseaux neuromusculaires (15).

#### **4.2. La douleur musculaire**

Les douleurs musculaires peuvent se manifester dans plusieurs situations telles que le DOMS, la dysfonction temporo-mandibulaire (DTM), et la fibromyalgie.

Dans le cas du DOMS, la douleur est beaucoup plus associée aux exercices excentriques (le muscle travaille en s'allongeant), qu'aux exercices concentriques (le muscle travaille en se contractant) (101, 102). La palpation et la pression sur les muscles donnent un inconfort qui n'est pas persistant. La douleur ne se manifeste pas en absence de stimulus sur les muscles. La douleur dans le DOMS est une douleur profonde qualifiée comme une hyperalgésie, mais il est impossible de la qualifier comme primaire ou secondaire. Dans le DOMS, il n'est pas possible de préciser si la douleur ressentie correspond à la

sensibilisation des nocicepteurs du tissu endommagé (hyperalgésie primaire) ou si la douleur siège autour du tissu endommagé et persiste même après l'arrêt des décharges provenant des nocicepteurs des tissus endommagés (hyperalgésie secondaire).

Selon une hypothèse, le DOMS découle d'une rupture des sarcomères musculaires et des dommages ainsi causés à leur membrane à la suite d'exercices excentriques. De tels événements provoquent des réponses inflammatoires dans l'aire abimée. Une invasion du tissu par des composantes inflammatoires comme les macrophages et les prostaglandines cause une première sensibilisation des nocicepteurs locaux, mais pour y avoir le déclenchement d'une hyperalgésie non persistante, il faut un deuxième stimulus (de la contraction, de la distension ou même de la pression) sur ce même tissu pour stimuler une fois de plus les nocicepteurs périphériques (98) .

Dans les cas de DTM, la douleur myalgique se manifeste comme une douleur sourde et persistante, qui augmente d'intensité avec le fonctionnement des mâchoires, dont la raideur, la fatigue et l'hyperalgésie à la palpation sont des caractéristiques constantes (54). Une autre constatation dans les cas de DTM vient des recherches de Turp et coll., où ils ont remarqué qu'il n'est pas rare que la douleur myalgique des mâchoires et la douleur myalgique sur les membres et le tronc se manifestent en même temps, ce qui peut suggérer que la DTM est une manifestation locale d'une condition plus générale (103, 104) . Benoliel et Sharav ont remarqué que la douleur myalgique chez les humains est généralement unilatérale, mais elle peut aussi se présenter de façon bilatérale,

surtout dans les cas de désordres généralisés tels que la fibromyalgie (105). De telles remarques suggèrent qu'une meilleure connaissance et une meilleure compréhension des états des douleurs liées est nécessaire (106) .

La fibromyalgie (FM) est un syndrome idiopathique, chronique, non articulaire et non inflammatoire qui est défini par une augmentation généralisée de la sensibilité des points douloureux (*tender points*) qui est fréquemment accompagnée de fatigue et d'un sommeil de mauvaise qualité (107). Selon l'Association Nationale pour la Fibromyalgie (*National Fibromyalgia Association – NFA*), la cause ou les causes de la fibromyalgie (FM) sont encore un mystère, mais plusieurs recherches suggèrent qu'elle dérive d'un désordre dans les processus centraux associé à une dérégulation des fonctions neuroendocriniennes et de la neurotransmission. La douleur chronique généralisée est un des premiers symptômes de la FM (108), cette douleur peut se présenter de manière migratoire et avec diverses intensités : elle peut être décrite comme un coup de poignard, ou comme lancinante, donnant des picotements, ou encore brûlante et présentant aussi des contractions, dont la raideur et l'intensité sont aggravées le matin et par d'autres phénomènes (le froid, l'humidité, la fatigue physique et mentale, l'activité physique excessive, le manque d'exercice, l'anxiété et le stress) (109) .

#### **4.2.1. Le glutamate et la douleur**

Le glutamate est un neurotransmetteur de grande importance pour les processus liés à la douleur, puisqu'il est présent un peu partout dans les voies

spinales et supra-spinales impliquées dans la transmission de la douleur. Il peut être trouvé en concentrations plus élevées dans l'amygdale des patients souffrant de douleur chronique comme la fibromyalgie (110). En outre, il est aussi fort probable que le glutamate joue un rôle important dans les processus nociceptifs périphériques (111, 112) et dans les processus de génération et de maintien de l'hyperalgésie dans les modèles de douleur inflammatoire (113) et non inflammatoire (63) .

Alfredson et Lorentzon ont démontré la présence de glutamate en périphérie, dans les tendons des humains, en utilisant expérimentalement la technique de microdialyse in vivo. Ils ont aussi apporté des évidences que dans des conditions de douleur chronique au tendon d'Achille, les niveaux ordinaires de glutamate sont beaucoup plus élevés (114) .

En périphérie l'injection d'agonistes des récepteurs glutamatergiques de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA), dans les muscles masséter chez l'homme cause de la douleur (115). Chez le rat, des enregistrements dans le ganglion du trijumeau révèlent que de telles injections produisent une décharge dans les fibres afférentes de ces muscles et que l'injection d'antagonistes des récepteurs NMDA comme l'acide 2-amino-5-phosphonovalérique (APV), la kétamine ou le dextrométhorphan, diminuent significativement les décharges évoquées par le glutamate (116) .

La kétamine, une substance ayant un effet anesthésique pouvant également bloquer les récepteurs NMDA, administrée de façon systémique réduit la douleur associée à des perfusions intramusculaire (IM) de solution



saline hypertonique chez les patients souffrant de fibromyalgie (117). Cet effet n'est cependant pas produit par le dextrométhorphan, un bloqueur des récepteurs NMDA dépourvu d'effet anesthésiant, dont l'effet est semblable chez les patients fibromyalgiques et les sujets témoins. Ceci suggère que l'augmentation de l'activité des récepteurs NMDA n'est probablement pas à la base de la douleur observée chez les fibromyalgiques (118) .

Pogatzki et coll. ont montré chez les rongeurs, qu'une incision du muscle gastrocnémien cause une hyperalgésie primaire suivie d'une hyperalgésie secondaire, impliquant les récepteurs AMPA/Kainate spinaux. Ces auteurs ont observé, au moyen d'injections intrathécales de bloqueurs des récepteurs AMPA/Kainate que la sensibilisation de ce type de récepteur contribue fortement aux comportements associés à l'hyperalgésie secondaire puisque l'effet des bloqueurs minimise seulement l'hyperalgésie secondaire en laissant l'hyperalgésie primaire intacte (119). D'ailleurs, le blocage des récepteurs ionotropes du glutamate par le 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione (NBQX) administré au niveau de la moelle épinière, est aussi efficace pour empêcher le développement de la douleur viscérale (120) .

Dans une étude en microdialyse sur le muscle trapézoïde effectuée chez des femmes souffrant de douleur chronique associée au travail, Rosendal et coll. ont démontré qu'il y a une association entre l'augmentation du glutamate et de la sérotonine (5-HT) intramusculaire et la sensation douloureuse, suggérant que des processus périphériques sont impliqués dans ces douleurs

chroniques (121). Par contre, aucune différence n'est notée dans les niveaux de glutamate périphérique mesurés par microdialyse dans les muscles trapézoïdes des sujets sains chez lesquels une douleur intense fut induite par l'injection IM d'un cocktail inflammatoire (bradykinine, histamine, sérotonine et prostaglandine E2) (122). Cette observation indique que le glutamate ne semble pas impliqué dans les processus périphériques sous-jacents à la douleur inflammatoire aiguë.

Cependant, dans une autre étude de douleur inflammatoire aiguë, induite par l'injection de capsaïcine dans les articulations temporo-mandibulaires (ATM) de rats, l'augmentation de l'activité électromyographique du masséter et du digastrique consécutive à ces injections est prévenue par un prétraitement intra-articulaire avec des antagonistes des récepteurs NMDA [(+)-5-méthyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK801) ou APV], suggérant que les récepteurs NMDA périphériques jouent un rôle dans le processus de sensibilisation causé par la capsaïcine (123, 124). Cette hypothèse est également appuyée par l'observation que la douleur induite chez l'homme par deux injections IM répétées de glutamate dans le muscle masséter est moindre lorsque de la kétamine est ajoutée à la deuxième injection (125).

#### **4.2.2. L'expression du glutamate et les fuseaux**

Le transporteur vésiculaire de glutamate VGLUT1 est trouvé dans les fuseaux musculaires des triceps de rats (126), ainsi que le long de leurs fibres primaires afférentes proprioceptives du type myélinisé (127), ce qui suggère

que ces fibres peuvent relâcher du glutamate en périphérie. De plus, les vésicules synaptiques des fibres afférentes des fuseaux musculaires peuvent elles aussi relâcher du glutamate qui participera au processus de maintien de l'excitabilité des terminaisons sensorielles périphériques (112). Une étude antérieure du laboratoire a démontré au moyen de l'immunohistochimie que des fibres de petit calibre longent les terminaisons annulo-spiralées marquées positivement par le VGLUT1 innervant les fuseaux musculaires des muscles massétéris. Ces petites fibres expriment des marqueurs tels que les peptides CGRP, la substance P et les récepteurs P2X<sub>3</sub> qui sont normalement associés aux nocicepteurs et portent également la sous-unité mGluR5 des récepteurs glutamatergiques métabotropes (15).

Un autre laboratoire a mis en évidence l'existence des récepteurs glutamatergiques du type mGluR5 dans le ganglion trijumeau et dans les fibres afférentes du masséter (111).

Un autre type de récepteur glutamatergique métabotrope, le récepteur du groupe I (excitateur) pourrait également jouer un rôle important dans les processus de la douleur inflammatoire (128) et non inflammatoire (111) dans les muscles de la face et de la tête.

## **5. Hypothèse et objectifs de l'étude**

L'objectif premier de notre projet était d'établir un modèle animal (chez le rat) de douleur musculaire orofaciale chronique, pouvant simuler la sensibilité

retrouvée chez les patients souffrant de douleur orofaciale myalgique. Notre hypothèse de travail postule que l'excitabilité des afférences fusoriales peut-être augmentée dans ce modèle de douleur et mener à une décharge antidromique qui pourra à son tour causer une libération de glutamate en périphérie et activer les nocicepteurs adjacents au sein de la capsule fusoriale (voir Fig 1). Selon notre hypothèse, l'activation des voies nociceptives repose en partie sur l'activation des récepteurs glutamatergiques trouvés sur les terminaisons musculaires des nocicepteurs. Notre second objectif visait donc à évaluer l'effet de l'injection intramusculaires d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques sur la douleur induite dans notre modèle.

## **Chapitre II**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODE**

## 1. Mise en contexte

Tous les protocoles dans ce projet ont été menés selon les directives du Conseil canadien de protection des animaux et approuvés par le comité de déontologie de l'Université de Montréal.

Un total de 105 rats males Sprague-Dawley ont été achetés de la compagnie Charles River-Québec. Nous avons choisi de ne pas utiliser de femelles en raison de la variabilité causée par le cycle œstral (période où les femelles deviennent matures sexuellement) lequel causerait une disparité de la taille entre les animaux males et femelles, et principalement parce que pendant ce cycle, les femelles pourraient présenter des variations dans leur seuil de nociception.

Les animaux arrivaient à notre animalerie au moins un jour avant le début de leur apprivoisement et deux jours avant la prise des premières mesures contrôle. Ils étaient logés en groupes de deux ou trois dans des cages en acrylique mesurant 60 centimètres de long, par 40 centimètres de profondeur et par 33 centimètres de haut et maintenus *ad libitum* dans un cycle de 12 heures d'alternance lumière-obscurité. Les animaux ont été manipulés pendant au moins deux jours afin de les habituer à l'expérimentateur. Des mesures des valeurs de base ont été prélevées trois jours avant la première injection. Les animaux sont alors âgés de 37 jours  $\pm$  3 et ont un poids oscillant entre 115 et 145 grammes. Lors de la journée de la première injection, leur poids variait entre 168 et 215 g et leur âge était d'environ 40 jours  $\pm$  3. Seuls les rats ayant

présenté des réponses stables pendant les trois jours consécutifs servant à établir le niveau de base des réponses ont subi les injections.

## **2. Substances et Solutions**

Les solutions pour les groupes témoins étaient des solutions salines (NaCl, 0.9%) neutres ou salines tamponnées (PBS) à pH 7.2.

Les groupes expérimentaux ont reçu une solution saline (NaCl, 0.9%) à pH 4,0 (HCl, 1M) ou une solution saline tamponnée (PBS) à pH 4,0. Divers bloqueurs des récepteurs glutaminergiques ont été testés. Ils étaient alors dissous soit dans la solution saline à pH neutre ou dans la solution acide selon le protocole et injectés de façon ipsilatérale aux injections de saline acide. Ces bloqueurs étaient l'acide D-2-amino-5-phosphonovalérique (Sigma, APV, 0.05M ; antagoniste des récepteurs NMDA) et le 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (Sigma, DNQX, 1,0 mM ; antagoniste des récepteurs AMPA/Kainate). De plus, nous avons aussi testé les bloqueurs des récepteurs métabotropes, 2-méthyl-6-phényléthynyl-pyridine (MPEP, 5,0 mM ; antagoniste sélectif des récepteurs mGluR5 du groupe I) et  $\alpha$ -méthyl-4-carboxyphénylglycine (MCPG, 5,0 mM ; antagoniste des récepteurs des groupes I et II).

### 3. Protocoles des injections

Pour procéder aux injections, les rats sont anesthésiés à l'isoflurane. Au début, les animaux étaient anesthésiés dans une « chambre » fermée. En cours d'expérimentation, nous avons opté pour l'usage d'une pompe à débit contrôlé pour l'isoflurane, afin de maintenir les animaux anesthésiés plus longtemps et de procéder plus lentement pour faire des injections et ainsi minimiser les dommages tissulaires.

Les injections se faisaient au centre des muscles masséterins à l'aide d'une seringue du type utilisé pour l'insuline, dont l'aiguille (29 G) était insérée à angle droit avec la surface de la peau. Selon le protocole, les injections pouvaient être unilatérales ou bilatérales.

Diverses solutions, dont les noms abrégés sont donnés ci-dessous ont été utilisées dans différents protocoles à différentes fins.

SA (t) = Solution saline tamponnée de pH 4.0

SN (t) = Solution saline tamponnée de pH 7.2

SA (nt) = Solution saline non-tamponnée de pH 4.0

SN-NA(nt) = Solution saline non-tamponnée de pH 7.2, non réajustée de pH final 5.8.

AI-SA(t) = Solution saline tamponnée de pH 4.0 contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropes (DNQX/APV)



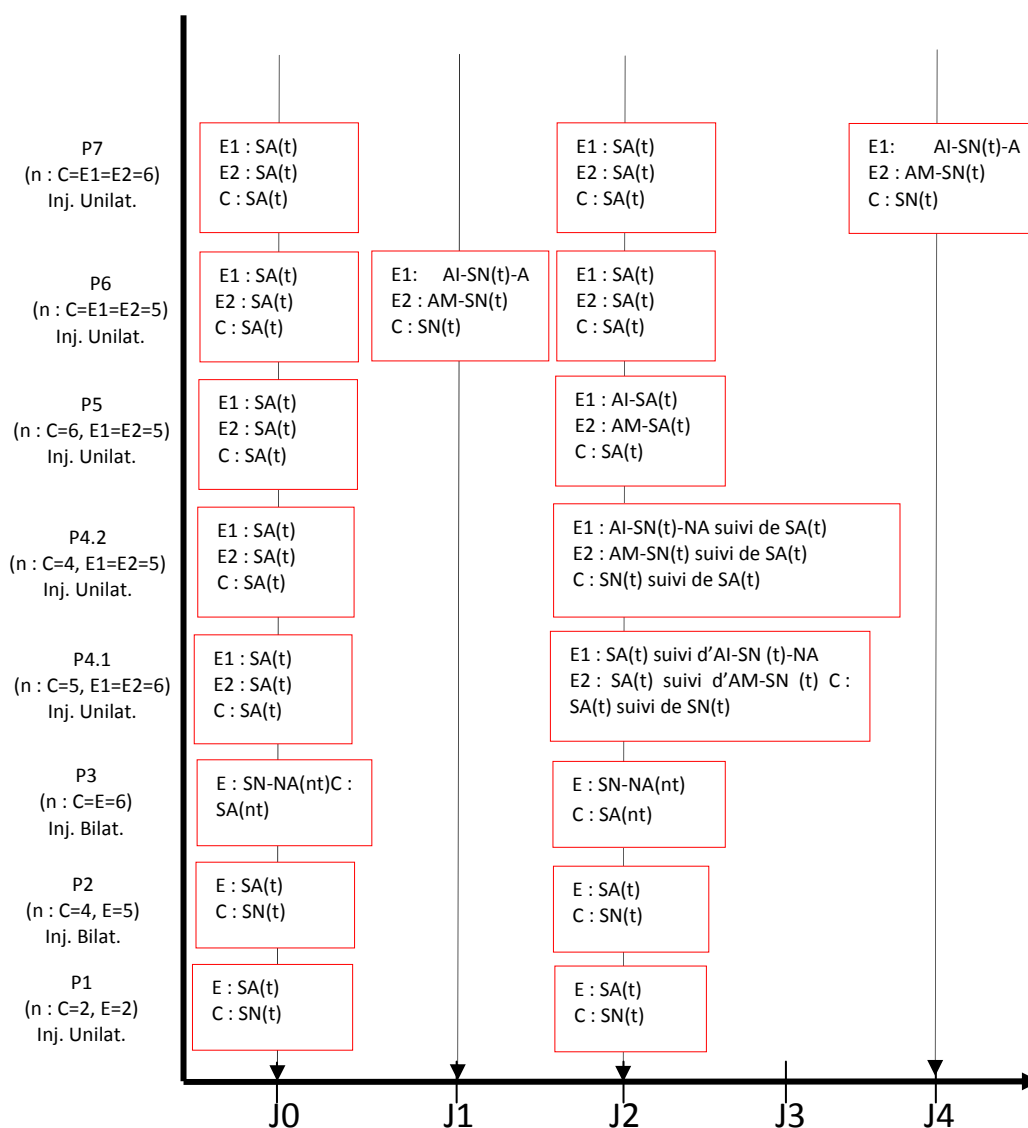
AI-SN(t)-A = Solution saline tamponnée de pH7.2, réajustée à 7.2 après l'ajout des drogues, contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropes (DNQX/APV)

AI-SN(t)-NA = Solution saline tamponnée de pH 7.2, non-réajustée après l'ajout des drogues et dont le pH final était entre 6.4 et 6.7, contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropes (DNQX/APV)

AM-SA = Solution saline tamponnée de pH 4.0 contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques métabotropes (MPEP/MCPG)

AM-SN(t) = Solution saline tamponnée de pH 7.2, réajustée à 7.2 après l'ajout des drogues, contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques métabotropiques (MPEP/MCPG)

La figure 2 décrit le moment des injections des solutions utilisées dans chacun des protocoles. Le nombre de rats utilisés dans chaque groupe ainsi que les côtés injectés sont indiqués sous chacun des protocoles (P1 à P7) à gauche



**Figure 2:** Ensemble des protocoles réalisés. C (Groupe témoin), E (Groupe expérimental), E1 (Groupe expérimental 1), E2 (Groupe expérimental 2), P (Protocole), J (jour) à compter de la première injection (J0). Inj. Unilat. (Injection unilatérale), Inj. Bilat. (Injection bilatérale), n (nombre d'animaux). Tous les traitements ont été injectés de façon ipsilatérale aux côtés injectés avec la solution saline acide.

#### **4. Mesure des seuils**

Pour les tests comportementaux, nous nous sommes basés sur la méthode de Ren (41) qui consiste à tester la sensibilité à l'aide des filaments de von Frey (FVF) sur des rats, préalablement acclimatés, dont la tête est légèrement coincée dans la main gantée du manipulateur. Ren a utilisé des gants en cuir lesquels deviennent de plus en plus imprégnés avec l'odeur des animaux pendant qu'ils sont manipulés. Nous avons préféré, dans notre méthode, utiliser des gants en tissus épais, pour mieux percevoir les mouvements des animaux tout en permettant une imprégnation de l'odeur des animaux.

Les rats étaient placés individuellement dans des cages acryliques transparentes environ 40 min. avant le début des essais, sauf les journées où ils recevaient des injections. Dans ces cas, ils demeuraient dans leurs cages 2 à 3 h avant pour laisser se dissiper les effets de l'isofluorane. Une telle procédure aide les animaux à s'habituer à l'environnement des tests et les cages transparentes permettent un meilleur aperçu du comportement animal avant et pendant les essais.

Pour procéder aux applications des FVF, nous avons légèrement adapté la méthode en ne prenant dans la main gantée de l'expérimentateur que le haut du corps de l'animal dont les pattes pouvaient reposer sur le plancher de la cage. Les rats ne subissaient aucune pression sur le corps destinée à restreindre

leurs mouvements, ce qui pourrait causer du stress et nuire à l'interprétation des réponses nociceptives.

Pour la prise des données de base, nous avons utilisé une séquence croissante de force d'un minimum de deux FVF (Stoelting, IL, U.S.A.) sur la peau recouvrant les muscles masséters. Cette séquence variait entre les filaments 4.74, 4.93, 5.07, 5.18 et 5.46, lesquels produisaient sur le tissu testé une pression équivalente respectivement à 6,0, 8,0, 10,0, 15,0 et 26,0 g. Chaque filament était testé dix fois sur chaque joue. Chaque application consistait à déposer le filament sur la joue, à exercer de la pression jusqu'à ce qu'il plie, et à le maintenir ainsi pendant une seconde. Un intervalle de 2 sec. était alloué avant de répéter la procédure. Le nombre de réponses positives (sur 10 applications) était noté. Était considéré comme réponse positive tout comportement manifestant une gêne ou un mouvement associé à la douleur suite à l'application du FVF ; tel que le retrait de la tête, tremblements ou contractions musculaires. Le nombre de réponses positives devait être stable pendant la période contrôle précédant les injections. Une augmentation significative du numéro de réponses positives, après les injections, était considérée comme de l'hypersensibilité mécanique. Le deuxième côté (joue) était testé tout de suite après le premier si l'animal était calme. Par contre, s'il apparaissait stressé, on le laissait se calmer afin de pouvoir le reprendre plus tard. Dans tous les cas, le manipulateur était aveugle au traitement reçu par les animaux et au protocole d'injection utilisé.

## **5. Les analyses statistiques**

Les résultats furent soumis au test de normalité D'Agostino & Pearson. De plus, ils furent aussi soumis à une analyse de variance one-way ANOVA suivie du test de Tukey pour procéder à de multiples comparaisons entre les moyennes des résultats des différents groupes testés à différentes journées des essais. Les valeurs de probabilité plus petites que 0,05 furent considérées comme statistiquement significatives.

### **Chapitre III**

### **RÉSULTATS**

## 1. Résultats généraux

Un total de 105 rats a été utilisé dans cette étude. La sensibilité mécanique à l'application de 10 applications consécutives des FVF fut évaluée de la façon décrite dans la section « Matériel et méthode » et le nombre de réponses noté. Toute augmentation statistiquement significative du nombre de réponses positives fut considérée comme une hypersensibilité mécanique. Le tableau I ci-dessous résume les résultats obtenus avec tous les protocoles utilisés.

**Tableau 1** : Effets des différents protocoles utilisés sur la sensibilité mécanique des muscles masséters

Protocoles	n	Solutions	Côté injecté	Jours et injections				Hypersensibilité mécanique	
				j0	j1	j2	j4	OUI	NON
1A	2	SA(t)	UNILATÉRAL	X		X		X	
1B	2	SN(t)	UNILATÉRAL	X		X			X
2A	5	SA(t)	BILATÉRAL	X		X		X	
2B	4	SN(t)	BILATÉRAL	X		X			X
3A	6	SA(nt)	BILATÉRAL	X		X		X	
3B	6	SN-NA(nt)	BILATÉRAL	X		X		X	
4.1A	6	SA(t) et AI-SA(t)-NA	UNILATÉRAL	X		X		X	
4.1B	6	SA(t) et AM-SN(t)	UNILATÉRAL	X		X			X
4.1C	5	SA(t) et SN(t)	UNILATÉRAL	X		X			X
4.2A	5	SA(t) et AI-SA(t)-NA	UNILATÉRAL	X		X		X	
4.2B	5	SA(t) et AM-SN(t)	UNILATÉRAL	X		X			X
4.2A	4	SA(t) et SN(t)	UNILATÉRAL	X		X			X
5A	5	SA(t) et AI-SA(t)	UNILATÉRAL	X		X		X	
5B	5	SA(t) et AM-SA(t)	UNILATÉRAL	X		X		X	
5C	6	SA(t)	UNILATÉRAL	X		X		X	
6A	5	SA(t) et AI-SN(t)-A	UNILATÉRAL	X	X	X			X
6B	5	SA(t) et AM-SN(t)	UNILATÉRAL	X	X	X			X
6C	5	SA(t) et SN(t)	UNILATÉRAL	X	X	X		X	

7A	6	SA(t) et AI-SN(t)-A	UNILATÉRAL	X		X	X	X	
7B	6	SA(t) et AM-SN(t)	UNILATÉRAL	X		X	X	X	
7C	6	SA(t) et SN(t)	UNILATÉRAL	X		X	X	X	

**Tableau I:** Dans la colonne Protocoles, les lettres A, B et C représentent les sous-groupes et les numéros de 1 à 7 représentent les protocoles réalisés.

L'étude a été divisée en plusieurs protocoles (P1 à P7). Dans un premier temps nous avons comparé les effets des injections unilatérales et bilatérales de solutions à différents pH, tamponnées ou non-tamponnées. Les premier et second protocoles (P1 et P2) utilisaient des solutions tamponnées et comparaient les effets des injections unilatérales à celles bilatérales. Le troisième protocole (P3) utilisait des solutions non-tamponnées injectées bilatéralement. Dans un second temps (P4-P7), nous avons cherché à mesurer l'effet de divers antagonistes des récepteurs glutaminergiques injectés à différents moments et dissous dans différents véhicules.

## 2. Effet du site d'injection et du type de solution utilisé

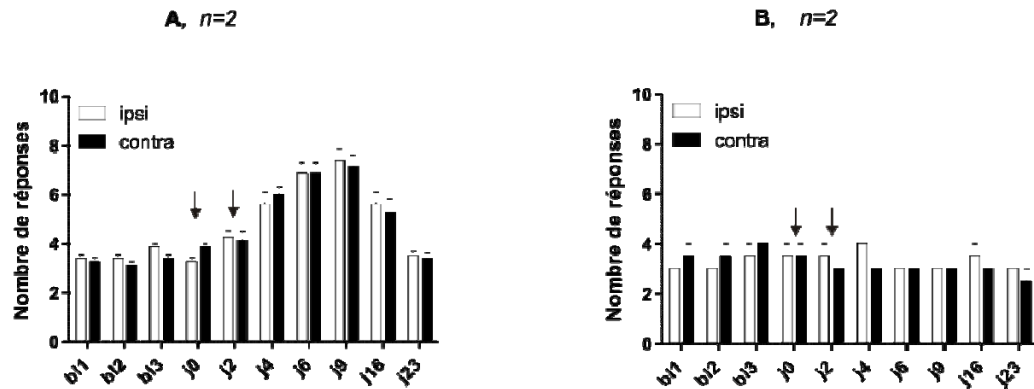
### 2.1. Protocole 1 : Effet de la saline acide tamponnée injectée unilatéralement

Le nombre de réponses obtenues à la suite de deux injections unilatérales dans les muscles masséters, d'une solution SA (t) et d'une solution SN (t) sont illustrés à la figure 3 (A et B respectivement). Dans ces graphiques comme dans tous les suivants, chaque colonne représente la moyenne et l'écart-



type du nombre de réponses obtenues à chaque jour d'essais sur une échelle de zéro à dix. Pour les groupes injectés unilatéralement, une colonne représente le côté ipsilatéral alors que l'autre représente le côté contralatéral. Pour les groupes ayant reçu des injections bilatérales, une colonne représente le côté droit de l'animal et l'autre le côté gauche. Sur les graphiques, les flèches indiquent les journées où les injections ont eu lieu et les étoiles indiquent les journées où le nombre de réponses positives aux applications des FVF était statistiquement différent de celui observé pendant la période de base précédant les injections.

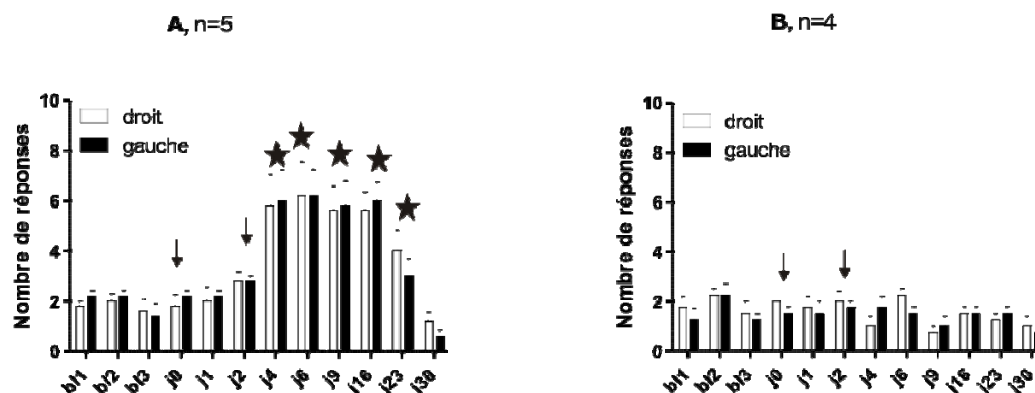
La figure 3A illustre clairement une augmentation durable du nombre de réponses obtenues débutant au second jour et durant jusqu'à 16 jours après la deuxième injection. Par contre, la même procédure avec une solution SN (t) ne cause aucun changement dans la perception de la douleur orofaciale (fig. 3B). De visu, une différence peut être observée dans les graphiques dans le seuil de la sensibilité mécanique bilatéralement après la deuxième injection. L'augmentation du nombre de réponses positives est plus remarquable pendant les jours j4, j6, j9, j16 dans le groupe traitement (3A), ce qui n'est pas observé dans le groupe témoin (3B). Ceci indique probablement l'existence d'une composante centrale dans le processus nociceptif de notre modèle, puisqu'une sensibilisation unilatérale produit de l'hyperalgésie bilatérale.



**Figure 3 :** Effets de la saline acide injectée unilatéralement. Groupe A injections unilatérales de SA (t) aux jours j0 et j2. Groupe B injections unilatérales de SN (t) aux mêmes jours. Hypersensibilité mécanique pendant les jours j4, j6, j9 et j16 dans le groupe A, mais pas dans le groupe témoin. FVF 5.07.

## 2.2. Protocole 2 : Effet du côté injecté

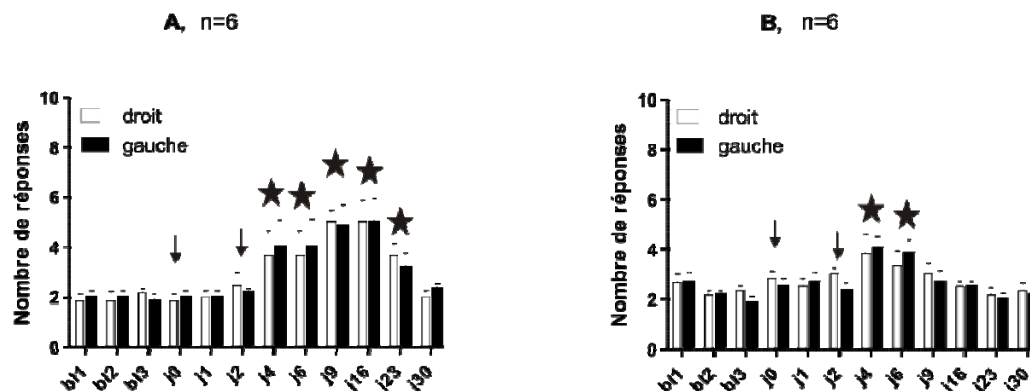
La figure 4 démontre que deux injections bilatérales dans les muscles masséters avec une SA (t), séparées de 48 heures, induisent une hypersensibilité mécanique dans la région orofaciale des rats. Une telle hyperalgésie perdure de deux à 23 jours après la deuxième injection SA (t) (fig. 4A). Par contre, la même procédure ne cause aucun changement sur la perception de la douleur orofaciale si on injecte une SN (t) (fig. 4B). La solution saline acide apporte des changements comportementaux statistiquement significatifs ( $p < 0.05$ ) bilatéralement pendant les jours j4, j6, j9, j16, j23 dans le groupe SA (t). Ainsi donc les effets des injections bilatérales ressemblent à ceux des injections unilatérales, à la différence qu'ils durent plus longtemps.



**Figure 4 :** Effets des injections de la saline acide injectée bilatéralement. Groupe A, injection bilatérale de SA (t) aux jours j0 et j2. Groupe B, injection bilatérale SN (t) au même moment que le groupe A. Hypersensibilité mécanique aux jours j4, j6, j9, j16, j23 dans le groupe A. FVF 5.46

### 2.3. Protocole 3 : Effet du tamponnage des solutions

Tout comme avec la saline acide tamponnée, deux injections bilatérales dans les muscles masséters, d'une solution SA (nt), séparées de 48 heures, induisent de l'hypersensibilité mécanique dans la région orofaciale des rats. Cette hypersensibilité débute deux jours après la seconde injection et dure jusqu'au 23<sup>e</sup> jour (Fig. 5A). La même procédure avec une solution acide neutre non-tamponnée et dont le pH ne fut pas ajusté (pH 5,8) (Fig. 5B) cause également une augmentation, mais beaucoup moindre du nombre de réponses, pendant seulement les deux à quatre jours suivant la deuxième injection de SN-NA (nt). Dans le groupe SA (nt) les changements considérés statistiquement significatifs sont observés des jours j4 à j23 (Fig. 5A), mais seulement de j4 à j6 dans le groupe SN-NA (nt) (Fig. 5B).



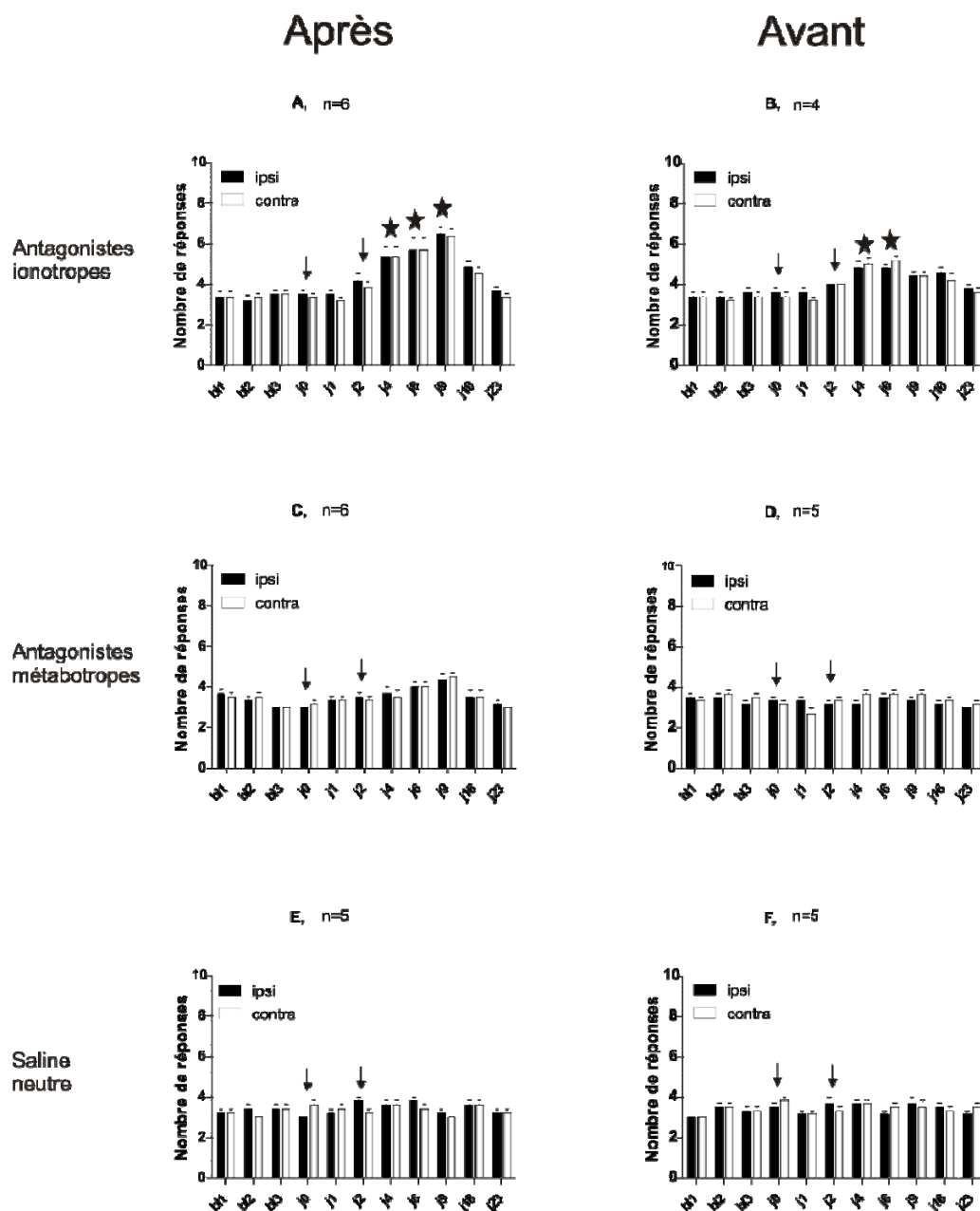
**Figure 5 :** Comparaison des effets de différents pH des solutions injectées. Groupe A, injections bilatérales de SA (nt); groupe B, injections bilatérales de SN-NA (nt) aux jours 0 et 2. Hypersensibilité mécanique aux jours j4, j6, j9, j16, j23 dans le groupe A et aux jours j4 et j6 dans le groupe B. FVF 5.46.

### 3. Les récepteurs glutamatergiques et la nociception

#### 3.1. Protocole 4 : Effet des antagonistes glutamatergiques administrés avant ou après la seconde injection

Dans le protocole 4, tous les groupes ont subi 2 injections de SA (t) à 2 jours d'intervalles. La seconde de ces deux injections était immédiatement suivie d'une troisième injection pour les groupes du protocole 4.1 (Fig. 6A, 6C et 6E), alors que dans le protocole 4.2 (Fig. 6B, 6D et 6F), la 3<sup>e</sup> injection précédait immédiatement la seconde injection de SA (t). Pour les deux groupes contrôle (Fig. 6E et 6F) la solution de cette 3<sup>e</sup> injection était de la SN (t), alors que pour les quatre expérimentaux, elle contenait soit les antagonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropes [AI-SN (t)-NA] (Fig. 6A et 6B) soit les antagonistes des récepteurs glutamatergiques métabotropiques AM-SN (t) (Fig. 6C et 6D). Selon les résultats illustrés dans la figure 6, les antagonistes des

récepteurs ionotropes n'ont pas réussi à prévenir l'augmentation de la sensibilité mécanique induite par les 2 injections de SA (t) (Fig. 6A et 6B). Toutefois, l'augmentation du nombre de réponses dans les deux cas n'était significative qu'aux jours j4, j6 et j9 dans les groupes traités avec des antagonistes des récepteurs ionotropes après la 2<sup>e</sup> injection de SA (Fig. 6A) et j4 et j6 pour le groupe traité avant (Fig. 6B). Les antagonistes des récepteurs métabotropiques se sont montrés plus efficaces pour prévenir l'hypersensibilisation mécanique (Fig. 6C et 6D). Une légère tendance à la hausse des réponses fut observée dans la figure 6C, mais la différence n'atteignait pas le seuil statistique. De façon étonnante, les injections de SN (t) ont également enrayé le développement de l'hypersensibilité (Fig. 6E et 6F). Ainsi, les seuls groupes dans lesquels une hypersensibilité fut observée dans ce protocole, sont les groupes où le pH de la 3<sup>e</sup> injection était également acide, ne serait-ce que faiblement.

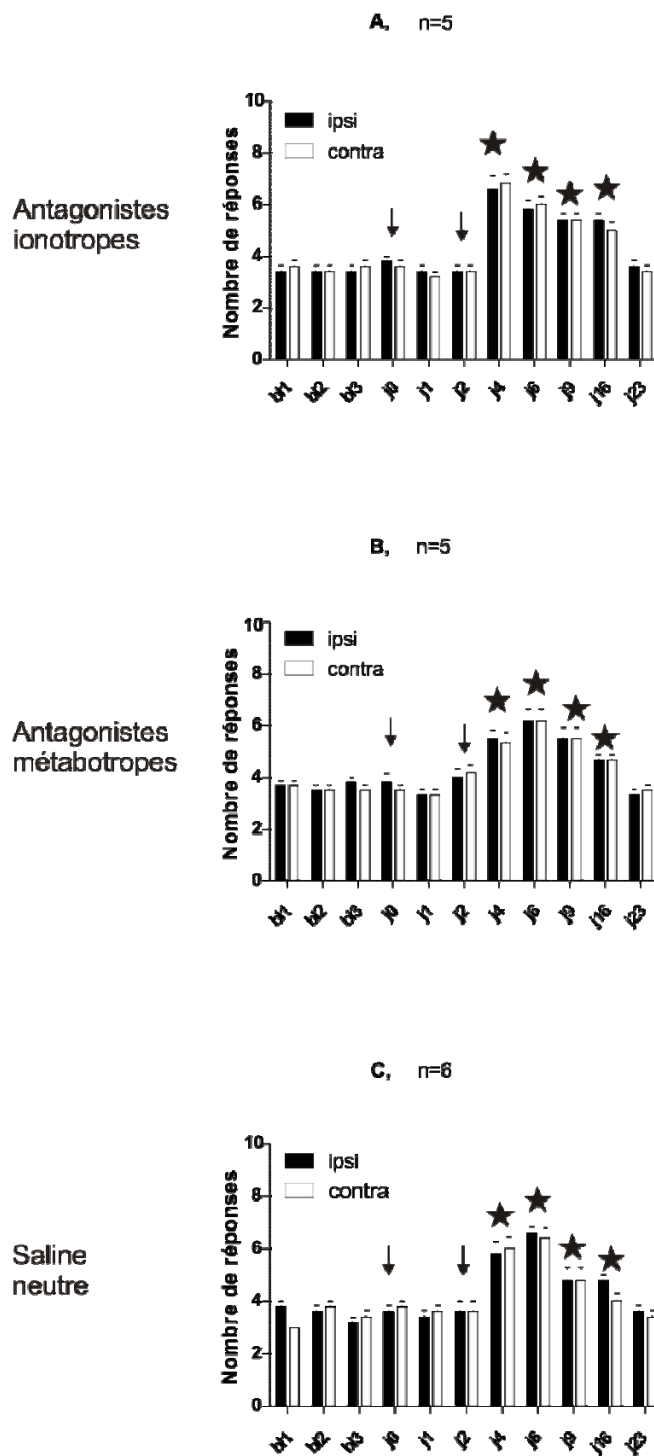


**Figure 6 :** Effets des antagonistes glutamatergiques administrés avant ou après la seconde injection de SA. Dans tous les sous-groupes, une injection de SA (t) a été administrée aux jours j0 et j2. A - D: Ces groupes reçurent une 3<sup>e</sup> injection de solutions contenant des antagonistes des récepteurs glutamatergiques ionotropes (AI-SN(t)-NA : groupes A et B) et métabotropes (AM-SN(t); groupes C et D) **tout de suite après** l'injection de SA (t) au jour J2 (groupes A et C), ou **tout de suite avant** l'injection de SA (t) au jour J2 (groupes B et D). E-F: Groupes témoins ayant reçu les injections de SN(t) tout de suite après et avant l'injection de SA (t) respectivement. Les étoiles indiquent  $p < 0.05$  par rapport à la période de base précédant les injections. FVF 5.07.

À la lumière des résultats surprenants obtenus avec le protocole 4 (Fig. 6), nous nous sommes demandés si la 3<sup>e</sup> injection n'interférait pas avec la seconde injection de SA (t) simplement en augmentant le volume musculaire, diluant ainsi l'effet du pH. Nous avons donc pour le protocole suivant incorporé les antagonistes glutamatergiques directement à la solution de SA (t) utilisée pour la seconde injection.

### **3.2. Protocole 5 : Effets des antagonistes directement incorporés à la solution saline acide**

Une hypersensibilité mécanique fut observée dans tous les groupes utilisés pour ce protocole où deux injections unilatérales furent effectuées dans les muscles masséters - une première ne contenant que du SA (t), suivie d'une seconde 48 h plus tard contenant soit de l'AI-SA (t), soit de l'AM-SA (t) ou de la SA (t) (Fig. 7 A, B et C).



**Figure 7** : Effet de l'incorporation des antagonistes glutamatergiques directement dans la solution de SA utilisée pour la deuxième injection. Deux injections unilatérales séparées de 48 heures en A, B et C, dont la première au jour j0 contenait de la SA (t) pour les trois groupes et la deuxième de la AI-SA(t), de la AM-SA(t) et de la SA(t) pour les groupes A, B et C respectivement au jour j2. Les étoiles indiquent  $p < 0.05$  par rapport à la période de base précédant les injections FVF 5.07



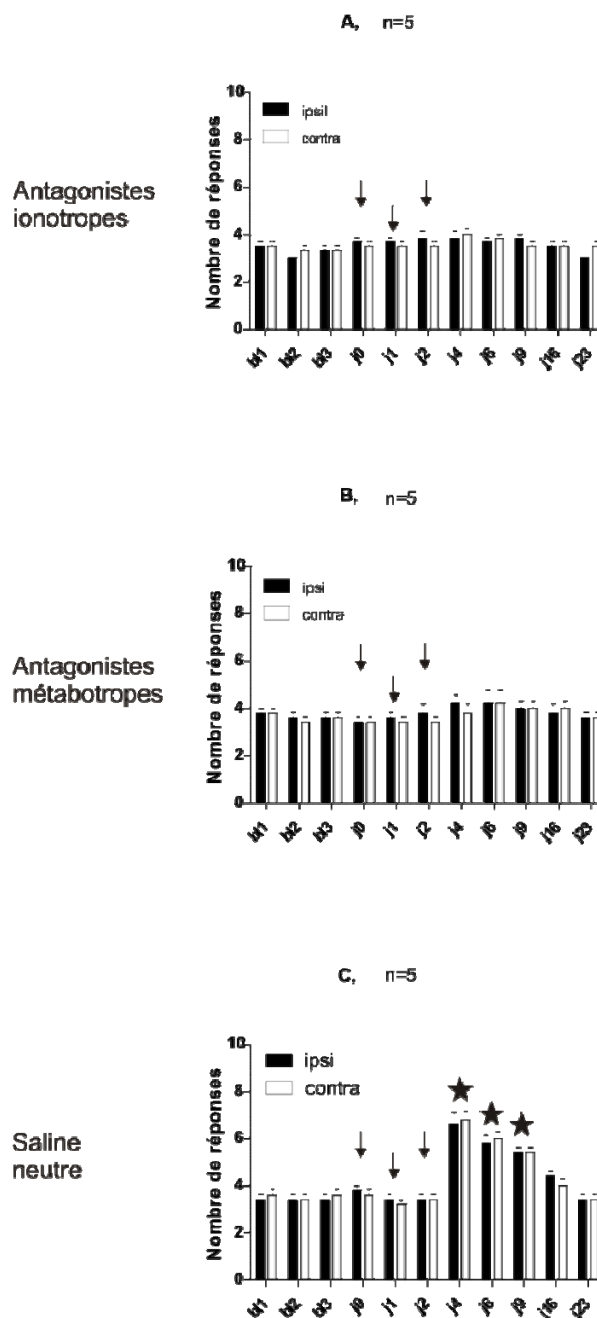
Dans les trois groupes, une augmentation significative du nombre de réponses fut observée du 4<sup>e</sup> au 16<sup>e</sup> jour suivant la première injection. Ces résultats étaient toutefois difficiles à interpréter puisqu'il est possible que l'inefficacité des antagonistes à bloquer le développement de l'hypersensibilité résulte du fait qu'ils aient été dissous dans un milieu trop acide qui les aurait ionisés. Afin d'élucider cette question et d'éviter de faire une 3<sup>e</sup> injection au moment même de la seconde injection de SA, nous sommes passés au protocole suivant.

À cette fin, nous avons proposé un nouveau protocole de traitement avec des antagonistes glutamatergiques.

### **3.3. Protocole 6 : Effets des antagonistes injectés entre les deux injections de solution saline acide**

Dans ce protocole, les antagonistes sont dissous dans une solution de saline neutre (pH 7.2) tamponnée et sont administrés 24 h après la première injection de SA (t) (et donc 24 h avant la seconde). Dans le groupe contrôle une solution de SN (t) est donnée au même moment. Dans ce cas, l'injection de SN (t) entre les deux injections de SA (t) n'empêche en rien le développement de l'hypersensibilité (Fig. 8C) contrairement à ce qui fut observé dans les deux groupes expérimentaux ayant reçu des antagonistes, qu'ils soient des récepteurs

ionotropes (Fig. 8A) ou métabotropiques (Fig. 8B) où il n'y eut aucune augmentation du nombre de réponses suite à la deuxième injection de SA.

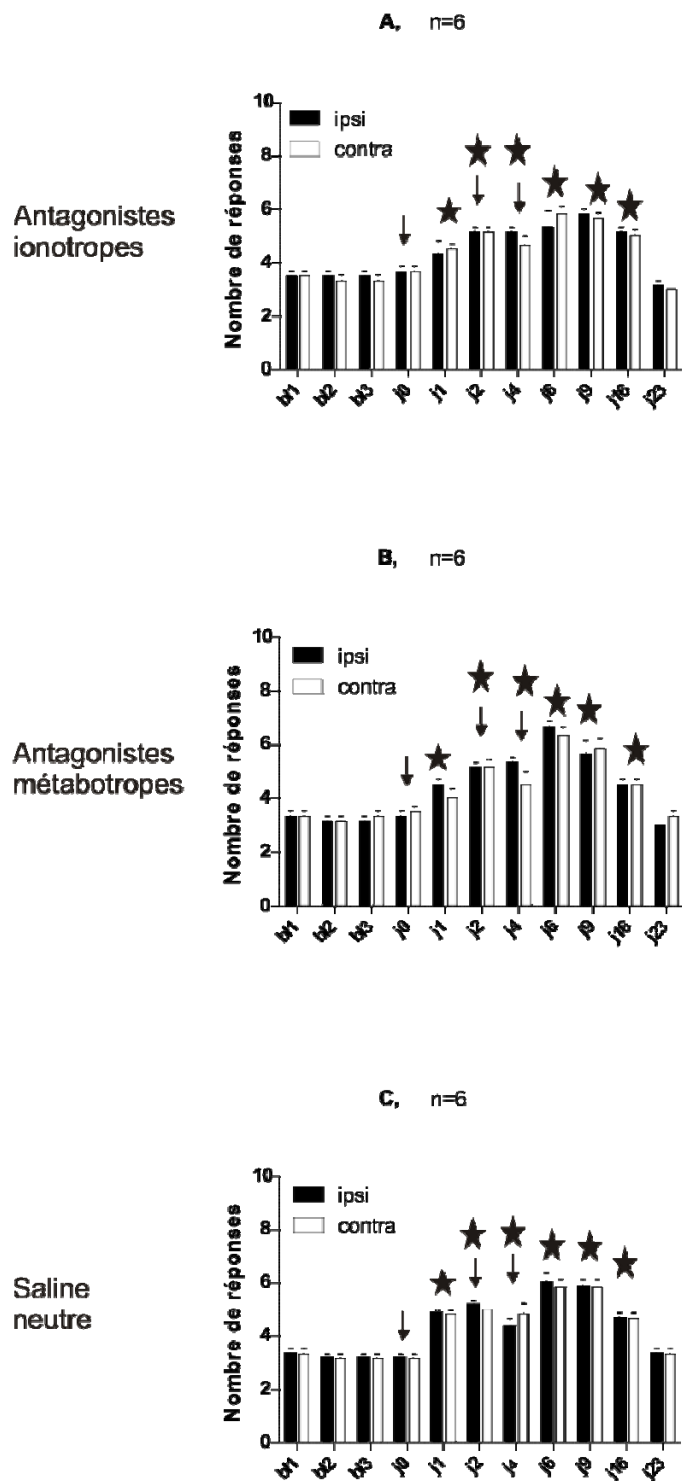


**Figure 8 :** Effets de l'injection des antagonistes glutamatergiques entre les deux injections de SA. Groupes A, B et C : injection de SA (t) aux jours j0 et j2. Injection de AI-SN (t)A (groupe A), de AM-SN (t) (groupe B) et de SN (t) (groupe C) au jour j1. Les étoiles indiquent  $p < 0.05$  par rapport à la période de base précédant les injections FVF 5.07.

Ces résultats suggèrent que les antagonistes des récepteurs glutamatergiques jouent un rôle dans le processus d'induction de l'hypersensibilité. Cependant, afin d'évaluer s'ils jouent également un rôle dans le maintien de la douleur, nous avons évalué l'effet de leur administration après que l'hypersensibilité se soit installée.

### **3.4. Protocole 7 : Efficacité curative des antagonistes**

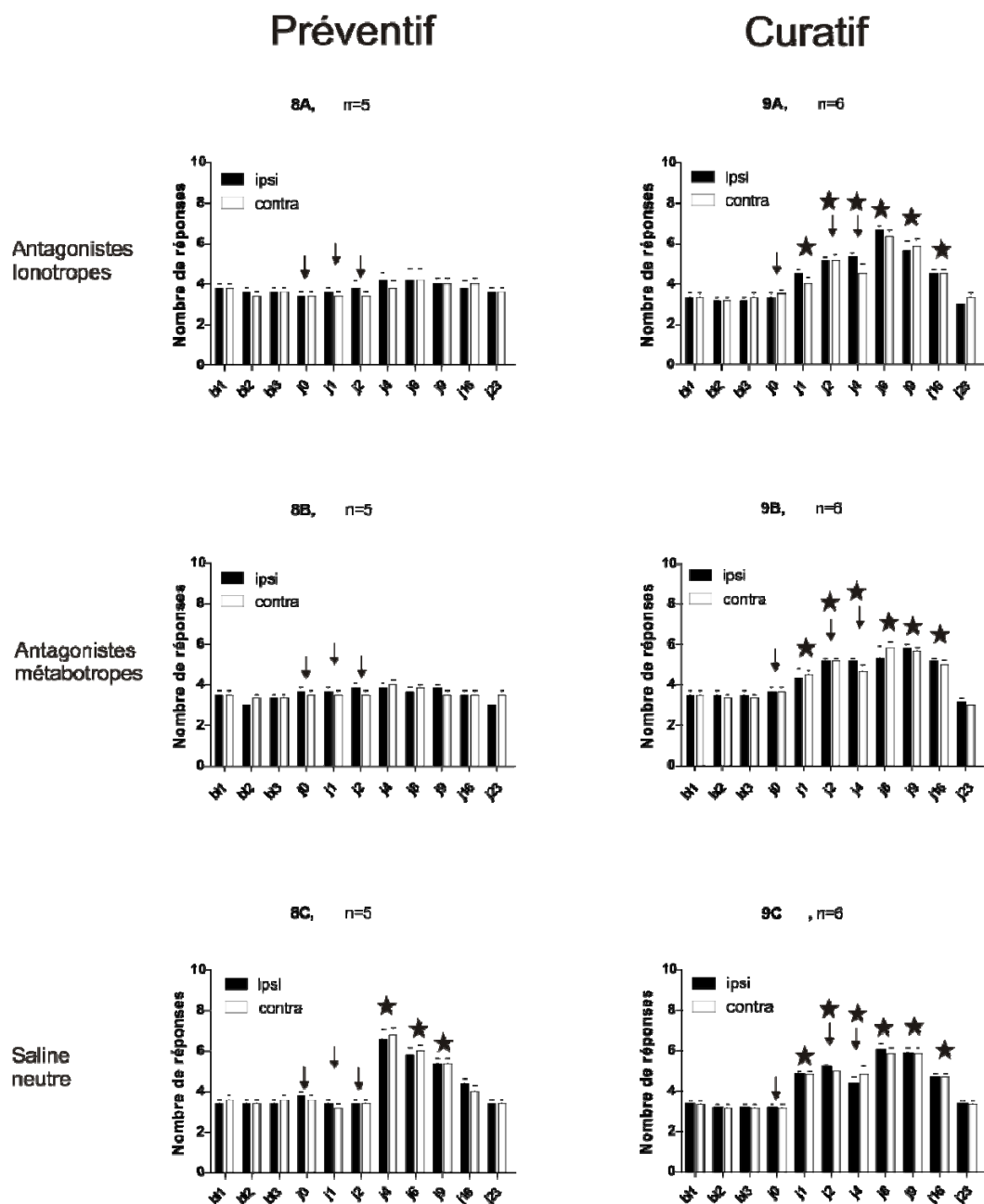
Selon nos premiers résultats, l'hypersensibilité débute vers la deuxième journée (j4) après la deuxième injection de SA (t). Nous avons donc administré nos antagonistes 2 jours après la seconde injection de SA (t). Le groupe contrôle (Fig.9C) reçut une solution de SN (t), alors que les deux autres (Fig 9A et 9B) reçurent respectivement une solution d'antagonistes des récepteurs ionotropes (Fig. 9A) et d'antagonistes des récepteurs métabotropiques (Fig. 9B). Les résultats de cette expérience illustrés dans la figure 9, montrent l'inefficacité de tous les traitements pour empêcher le développement de l'hypersensibilité mécanique. Ceci suggère que le mécanisme de maintien de la douleur myalgique faciale dans notre modèle n'est pas uniquement dépendant des récepteurs glutamatergiques périphériques.



**Figure 9** : Effets de l'injection des antagonistes glutamatergiques deux jours après la seconde injection de SA. Trois injections séparées de 48 heures. Groupes A, B et C : injection de SA (t) aux jours j0 et j2. Injection d'AI-SN (t)-A dans le groupe A, d'AM-SN (t) dans le groupe B et de SN (t) dans le groupe C au jour j4. Des changements statistiquement significatifs ont été observés dans tous les groupes pendant les jours j1, j2, j4, j6, j9 et j16. FVF 5.07.

### **3.5. Comparaison entre le traitement préventif et curatif**

Quand on compare *de visu* les résultats des protocoles 6 et 7 (Fig. 8 et 9) dans une seule figure (Fig. 10), on remarque que les traitements réalisés avant que le processus hyperalgésique soit installé sont vraiment efficaces pour empêcher le déclenchement de la douleur [Fig. 10 (8A et 8B)]. Par contre, si le traitement est effectué après que la douleur soit installée, il n'est pas efficace et ne diffère pas du traitement contrôle [Fig. 10 (9A, 9B et 9C)].



**Figure 10** : Comparaison entre les traitements préventif et curatif des protocoles 6 (Fig. 8A, 8B et 8C) et 7 (Fig. 9A, 9 B et 9C). Comparaison des données présentées dans les figures 8 et 9 où les traitements (antagonistes ionotropes : A; métabotropes : B, ou saline neutre : C) sont donnés entre les deux injections de SA (t) (colonne de gauche) vs 2 jours après la 2<sup>e</sup> injection de SA (t) (colonne de droite). Les étoiles indiquent  $p < 0.05$  par rapport à la période de base précédant les injections.

## **Chapitre IV**

### **DISCUSSION**

## Discussion

L'objectif principal de notre étude était d'établir un modèle animal de douleur chronique orofaciale grâce auquel nous évaluerions le rôle des récepteurs glutamatergiques périphériques dans le processus de la douleur chronique en testant l'efficacité analgésique de différents antagonistes de ces récepteurs appliqués au niveau intra-massétérein.

Notre modèle a été basé sur le modèle de Sluka (2001), puisque ce modèle induit une hypersensibilité des tissus mous avec chronicité et en absence de dommages tissulaires.

Dans le modèle de Sluka, l'hyperalgésie plafonne pendant les deux premières semaines suivantes la deuxième injection unilatérale (IM) de solution saline acide à pH 4.0 . Dans notre modèle, l'expression maximale de l'hypersensibilité orofaciale figure entre la 4<sup>e</sup> et la 16<sup>e</sup> journée après la première injection unilatérale de solution saline acide IM. Par contre, nous n'avons pas remarqué d'hypersensibilité généralisée dans notre modèle comme ils l'ont remarqué (données non publiées), bien qu'elle s'étende au côté controlatéral.

Par le biais de notre étude, nous avons démontré que deux injections de SA tant unilatérales que bilatérales (tamponnées ou pas), réalisées dans les muscles masséters de rats causent une augmentation des réponses nocifencives bilatéralement sur la joue des animaux. De plus nous avons observé que l'administration locale d'antagonistes glutamatergiques peut prévenir le



déclenchement de l'hypersensibilité mécanique causé par les injections de SA, lorsqu'ils sont administrés de façon préventive. Par contre, leur usage curatif, c-à-d le potentiel de renverser la douleur, semble n'avoir aucun effet dans le développement du processus hyperalgésique.

Des études précédentes ont démontré que l'administration IM d'une solution acide (SA) chez l'homme cause des épisodes musculaires hyperalgésiques de courte durée (43, 129, 130). Cependant, des études menées avec des animaux ont mis en évidence que de telles procédures génèrent des changements de longue durée dans le comportement nocifensif face à un stimulus mécanique (Sluka et al., 2001 et 2003), ainsi que des changements durables des propriétés électrophysiologiques des afférences fusoriales de gros calibre (Lund et al., 2010).

Des études électrophysiologiques ont mis en évidence que le potentiel membranaire de repos des neurones du MesV de rats ayant reçu des injections de SA dans le masséter est plus hyperpolarisé que celui des neurones contrôles. Des changements sont aussi observés sur le seuil de déclenchement des potentiels d'action, sur les oscillations membranaires, sur le seuil des décharges en bouffées et sur les rectifications entrantes et sortantes. En plus de l'augmentation de l'amplitude des oscillations membranaires, des décharges spontanées des neurones exposés à la SA ont aussi été observées, mais jamais dans les neurones contrôles (SN) (15).

L'immunohistochimie a permis de démontrer que les fibres annulo-spiralées des fuseaux des muscles orofaciaux (chez le rat) contiennent le transporteur vésiculaire du glutamate (VGLUT1) et que des fibres de petit calibre longent ces fibres annulo-spiralées. Ces petites fibres expriment des marqueurs pouvant être associés aux nocicepteurs (CGRP, Substance P, TRPV1, P2X<sub>3</sub>) ainsi que des récepteurs métabotropiques glutamatergiques (15).

Ces données électrophysiologiques, immunohistochimiques et comportementales réunies nous fournissent des indices suggérant un lien entre la douleur persistante et les récepteurs glutamatergiques périphériques dans notre modèle.

Ainsi, nos données confirment le lien existant entre l'hypersensibilité musculaire et la baisse du pH tissulaire, tel que rapporté par Sluka et coll.(12), Issberner et coll. (43) et Weerakkody et coll. (97, 98).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le lien entre le pH acide et la douleur persistante. Par exemple, les canaux ASIC qui se trouvent dans le système nerveux central et périphérique, et les récepteurs TRPV1 sont des candidats intéressants qui peuvent jouer un rôle dans de tels mécanismes.

En 2003, Sluka et coll. ont démontré le rôle des canaux ASIC dans le processus de la douleur musculaire persistante. Sur des rats hyperalgésiques, ils ont effectué un traitement IM préventif avec un antagoniste ASIC non sélectif (l'amiloride) avant la double sensibilisation avec SA. Les résultats ont

démontré que cette molécule est capable de prévenir le développement de l'hypersensibilité générée dans leur modèle. De plus, ils ont démontré que des animaux *knock-out* pour le ASIC3, mais pas les *knock-out* ASIC1, ne présentent pas d'hyperalgésie mécanique avec les injections de SA, c'est-à-dire que les canaux ASIC3 jouent un rôle dans leur modèle de douleur induite, mais pas les canaux ASIC1.

Nakanish et coll. (2010) ont démontré, chez les rats, que l'activation du TRPV1 par le pH acide résulte en une augmentation de l'expression du CGRP (*Calcitonin gene related peptide*) conduisant à l'induction d'une hypersensibilité (131). De plus, Bevan et Geppeti ont déjà démontré que les récepteurs TRPV1 réagissaient aux changements du pH environnemental (132).

Même s'il n'y a pas d'évidence que les neurones du MesV expriment les canaux ASIC3 ou les récepteurs TRPV1, ils sont capables de répondre à des baisses de pH (15, 133). Alors, dans notre hypothèse de base, nous avons suggéré un troisième mécanisme au cours duquel l'hyperexcitabilité des afférences fusoriales (MesV) produirait des potentiels d'action spontanés qui se propageraient de façon antidromique le long de leur axone et qui généreraient une augmentation de la libération de glutamate en périphérie. Le glutamate, à son tour, pourraient activer les récepteurs glutamatergiques périphériques dont Lund et coll. (15) ont démontré la présence sur de petites fibres, potentiellement des nocicepteurs, à proximité des terminaisons annulo-spiralées. Selon notre

hypothèse, il serait probable que ces récepteurs glutamatergiques soient impliqués dans le processus de la douleur musculaire persistante.

### **Des injections de solution saline acide causent de l'hypersensibilité orofaciale.**

L'acidité tissulaire des masséters, ainsi que le suivi de la première injection acide par une deuxième 48 heures plus tard, sont fondamentaux pour l'installation de l'hypersensibilité dans notre modèle. Selon Sluka et coll. (12), le délai entre les deux injections ipsilatérales est crucial pour la mise en marche de ce processus, puisque, dans ses études, des injections à intervalles de 2 ou 5 jours sont efficaces pour l'installation du processus hyperalgésique, mais pas les injections à intervalles de 10 jours.

Nous avons aussi démontré que la sensibilisation causée par deux injections unilatérales (SA) provoque une hyperalgésie orofaciale bilatérale. Ceci nous mène à croire à l'existence d'une composante centrale dans ce processus.

Traditionnellement, on considère que la sensibilisation centrale est due à une potentialisation hétérosynaptique, mais elle peut aussi dépendre de changements dans la microglie et les astrocytes, dans l'excitabilité membranaire et dans la transcription des gènes (134). Selon Woolf (135), les dommages tissulaires périphériques répétés s'accompagnant de profondes altérations dans la nociception ne résultent pas seulement de l'augmentation de l'excitabilité

des fibres afférentes, mais peuvent aussi signaler une réduction de l'inhibition due à une diminution de la synthèse, ou de l'action des neurotransmetteurs inhibiteurs ou encore à une moindre activité des interneurons inhibiteurs. Autrement dit, la sensibilisation centrale n'est pas toujours dépendante d'une forte sensibilisation périphérique. Citons l'exemple de la fibromyalgie et de la migraine, où la sensibilisation centrale aurait probablement une origine autonome (135).

Selon les études de Sluka, l'activation du canal ASIC3 par le pH acide cause une augmentation de la libération de glutamate et d'aspartate dans la corne dorsale de la moelle épinière. Cette augmentation est observée 24h suivant l'injection et jusqu'à 1 semaine après la 2<sup>e</sup> injection de solution saline acide. Ces données corroborent l'existence d'une composante de sensibilisation centrale dans son modèle. Le réseau glial ne semble pas mis en cause dans ce modèle puisque l'hyperalgésie n'est pas renversée par l'interleukine-1, un inhibiteur métabolique glial et que des données immunohistochimiques ne révèlent pas d'activation gliale pendant la période hyperalgésique (23). DeSantana et coll. (136) ont démontré que dans le modèle de Sluka les aires supraspinales sont impliquées dans le processus hyperalgésique, puisque des injections bilatérales de ropivacaine (anesthésique local) concomitantes, dans les nucleus raphe magnus et dans le noyau gigantocellulaire, renversent complètement l'hyperalgésie primaire (muscle) et secondaire (peau) causée par la 2<sup>e</sup> injection acide IM. Sur la base de ces données, ils ont suggéré que, dans

ce modèle, les changements induits au niveau des structures supraspinales mènent à une sensibilisation centrale et une hyperalgésie généralisées chez les rats (136).

Dans leur travail sur l'induction de l'hyperalgésie musculaire chez le rat, utilisant le modèle de Sluka , Da Silva et coll. (66) ont également démontré une composante centrale dans leur modèle, en démontrant que la micro-injection d'un antagoniste des récepteurs NMDA dans la région médullaire rostro-ventro-mediane (RVM) renverse l'hypersensibilité musculaire et cutanée généralisée. De plus, Sluka et coll. (12) avaient déjà démontré que l'application d'un anesthésique local ou même l'élimination des inputs des afférences primaires par une rhizotomie ne pouvaient éliminer l'hyperalgésie contralatérale induite dans son modèle.

Nos données corroborent celles de Sluka et coll. (12), de DeSantana et coll. (136) et de Da Silva et coll. (66), puisque nous observons aussi une hypersensibilité bilatérale chez le rat suite à des injections unilatérales. Les voies anatomiques impliquées dans cette sensibilisation contralatérale n'ont pas été identifiées dans cette étude, mais elles pourraient impliquer les projections des fibres des neurones du MesV vers la portion caudale du noyau spinal (137) et les nombreuses projections aux interneurones commissuraux de la région peritrigéminale (128) et même du noyau moteur

De manière similaire à ce que nous avons observé avec les injections unilatérales, les injections bilatérales de SA causent aussi une hypersensibilité bilatérale, sauf que celle-ci dure plus longtemps que dans le cas des injections unilatérales. Ainsi, les injections unilatérales de SA provoquent des changements jusqu'à 16 jours après la première injection (protocole 1, fig. 3A) alors que l'effet de l'administration bilatérale de SA dure 23 jours (protocole 2, fig. 4A). Cependant, à un pH moins acide, comme celui utilisé dans le sous-groupe B du protocole 2 (injections bilatérales à pH 5,8, fig. 4B), l'hypersensibilité ne subsiste que pour une brève période de deux jours. Il est possible que cette gradation dans la durée des effets en fonction du pH et du nombre de sites d'injections reflète la robustesse d'activation des voies périphériques qui déterminerait ensuite le niveau d'activation et de plasticité des voies centrales impliquées dans le maintien de l'hypersensibilité.

Nos résultats diffèrent de ceux d'Ambalavanar et coll. (138), qui n'ont pas observé d'augmentation de l'activité hyperalgésique après des injections de SA dans les masséters de rats. Cette différence peut s'expliquer partiellement par la méthodologie utilisée. Ils ont mesuré la force nécessaire pour induire le retrait de la tête de l'animal à l'aide d'un filament rigide relié à un capteur de force. Leurs données indiquent des variations importantes dans les seuils de force nécessaire au retrait (de 1 à 2 N), avec une grande variabilité entre les animaux et les expériences (138). Comme l'ont fait Sluka et coll. (12), nous avons comparé la fréquence des réponses nocifensives à l'aide de filaments de

von Frey. Nous avons trouvé des différences significatives entre les groupes expérimentaux et témoins avec des filaments générant des forces de 0,15 et 0,26 N. En outre, comme signes de douleur, nous avons pris en considération non seulement le retrait de la tête de l'animal, mais aussi les tremblements de corps et les contractions musculaires des animaux. À notre avis, notre méthodologie est plus efficace pour évaluer les changements comportementaux des animaux, puisque qu'elle les détecte avec plus de précision et moins de variabilité.

Le tamponnage de la solution acide ne semble pas être un facteur dans le décours temporel du développement de l'hypersensibilité (protocole 2, Fig. 4A; protocole 3, fig. 5A), ce qui nous a permis de travailler avec des solutions tamponnées, plus stables aux changements de pH dans le temps et donc, plus pratiques à l'utilisation.

Une fois notre modèle de douleur établi, nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle le glutamate jouerait un rôle dans les mécanismes périphériques pro-hyperalgésiques. Pour tester une telle hypothèse, nous avons donc proposé une série d'expérimentations où les antagonistes glutamatergiques ont été injectés localement dans le masséter.

Les résultats obtenus avec le protocole 4 (Fig. 6) ont semblé mettre en doute l'hypothèse de départ puisqu'il y a eu le développement d'hyperalgésie avec l'administration des antagonistes glutamatergiques ionotropes, mais pas dans le contrôle (SN) ni avec les antagonistes métabotropiques. Nous nous attendions à



observer le développement de la douleur chez les animaux n'ayant pas reçu d'antagonistes glutamatergiques (contrôle : SN), mais pas chez ceux les ayant reçus. Il est possible que la douleur observée avec les antagonistes ionotropes soit due à la légère acidité de ces derniers en solution (comparativement aux deux autres solutions). Le salin neutre et le mélange d'antagonistes métabotropiques avaient des pH neutres et il est possible que leur injection dans un laps de temps rapproché de la seconde injection du salin acide ait interféré avec la capacité de cette dernière de faire diminuer le pH tissulaire nécessaire au déclenchement de la douleur. Ceci montre une fois de plus que le processus est très fortement dépendant du suivi de la deuxième stimulation acide qui, nous l'avons maintenant compris, doit atteindre un certain niveau d'acidité intramusculaire.

Pour vérifier à nouveau s'il existe un rapport entre les récepteurs glutamatergiques périphériques et la douleur dans notre modèle, nous avons incorporé les antagonistes glutamatergiques à la deuxième injection acide (protocole 5, fig. 7). Les résultats suggèrent une fois de plus que l'acidité tissulaire et les deux sensibilisations avec une injection acide sont nécessaires pour le développement de l'hyperalgésie dans notre modèle.

Il est possible que l'inefficacité des antagonistes à contrer la douleur observée dans le protocole 5 résulte du fait qu'ils aient été dénaturés ou ionisés lorsque mis en solution acide.

Comme de telles expériences (protocole 5, fig. 7) ne permettaient pas, à notre avis, d'interprétations claires, de par la présence de multiples facteurs, nous avons décidé de tester l'effet des antagonistes glutamatergiques dans des situations où ni l'acidité ni le mélange de substances ne seraient en cause. Ceci offre en outre l'avantage d'imiter de façon plus réaliste les cas de douleurs orofaciales traitées en clinique dentaire, puisque les patients y arrivent avec la douleur déjà installée ou même pendant une période réfractaire de la maladie.

La comparaison des résultats obtenus avec les protocoles 6 et 7 (voir Fig. 10) indique clairement que les antagonistes glutamatergiques administrés de façon « préventive » entre les deux injections de SA empêchent totalement le développement de l'hypersensibilité, alors que leur administration « curative » (ç-à-d une fois la douleur installée) est inefficace pour enrayer la douleur.

Ceci suggère fortement que les récepteurs glutamatergiques périphériques jouent un rôle dans l'induction de l'hypersensibilité dans notre modèle de douleur orofaciale, mais pas dans son maintien à long terme.

Nos données suggèrent que la première injection produit probablement une sensibilisation des récepteurs glutamatergiques périphériques qui, lorsque réactivés par une seconde injection, déclenchent un processus qui se maintient grâce à une composante centrale. L'injection d'antagonistes glutamatergiques avant la seconde injection d'acide prévient l'induction de cette réaction tant au niveau périphérique que central. Toutefois, un processus différent est

responsable du maintien de la douleur une fois induite puisque les antagonistes administrés 2 jours après son induction sont inefficaces.

## **Chapitre V**

## **CONCLUSION**

## **Conclusion**

Dans cette étude, nous avons confirmé que des injections répétées d'une solution saline acide dans les muscles de la mâchoire produisent une hypersensibilité de longue durée. Nos résultats suggèrent que ce processus s'amorce en périphérie par une activation ou une sensibilisation des récepteurs glutamatergiques, mais que le maintien de la réponse implique un processus central ou un processus périphérique indépendant du glutamate. Ces données supportent notre hypothèse originale voulant que l'hyperexcitabilité des afférences fusoriales puisse mener à une libération de glutamate en périphérie par les fibres annulospirales et causer l'activation de terminaisons nociceptives à proximité. Toutefois, bien que nos données supportent l'hypothèse qu'il y ait activation de récepteurs glutamatergiques en périphérie, elles ne nous renseignent pas sur l'origine de ce glutamate ni sur le type d'afférences directement activées par ces récepteurs. D'autres expériences seront requises pour faire la discrimination entre les différentes possibilités.

En conclusion, nous croyons que ce modèle de douleur offre des avenues de recherche extrêmement intéressantes qui pourront éventuellement contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine des myalgies faciales persistantes.

## Bibliographie

1. Harold M, Nikolai B, editors. Classification of Chronic Pain 1994.
2. Lynch ME, Schopflocher D, Taenzer P, Sinclair C. Research funding for pain in Canada. *Pain Res Manag.* 2009;14(2):113-5.
3. Boonen A, van den Heuvel R, van Tubergen A, Goossens M, Severens JL, van der Heijde D, et al. Large differences in cost of illness and wellbeing between patients with fibromyalgia, chronic low back pain, or ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(3):396-402.
4. Lipton JA, Ship JA, Larach-Robinson D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *J Am Dent Assoc.* 1993;124(10):115-21.
5. Tecco S, Festa F. Prevalence of Signs and Symptoms of Temporomandibular Disorders in Children and Adolescents with and without Crossbites. *World J Orthod.* 2010;11(1):37-42.
6. Steinmetz A, Ridder PH, Methessel G, Muche B. Professional musicians with craniomandibular dysfunctions treated with oral splints. *Cranio.* 2009;27(4):221-30.

7. Xie Y, Zhang J, Petersen M, LaMotte RH. Functional changes in dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction in the rat. *J Neurophysiol.* 1995;73(5):1811-20.
8. Tsuboi Y, Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Matsumoto S, Kitagawa J, et al. Alteration of the second branch of the trigeminal nerve activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Pain.* 2004;111(3):323-34.
9. Sukhotinsky I, Ben-Dor E, Raber P, Devor M. Key role of the dorsal root ganglion in neuropathic tactile hypersensitivity. *Eur J Pain.* 2004;8(2):135-43.
10. Kitagawa J, Takeda M, Suzuki I, Kadoi J, Tsuboi Y, Honda K, et al. Mechanisms involved in modulation of trigeminal primary afferent activity in rats with peripheral mononeuropathy. *Eur J Neurosci.* 2006;24(7):1976-86.
11. Sluka KA, Rohlwing JJ, Bussey RA, Eikenberry SA, Wilken JM. Chronic muscle pain induced by repeated acid Injection is reversed by spinally administered mu- and delta-, but not kappa-, opioid receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(3):1146-50.

12. Sluka KA, Kalra A, Moore SA. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve*. 2001;24(1):37-46.
13. Szentagothai J. Anatomical consideration of monosynaptic reflex arcs. *JNeurophysiol*. 1948;11:445-54.
14. Corbin K, Harrison F. Function of mesencephalic root of fifth cranial nerve. *JNeurophysiol*. 1940; 3:423-35.
15. Lund JP, Sadeghi S, Athanassiadis T, Salas NC, Auclair F, Thivierge B, et al. Assessment of the potential role of muscle spindle mechanoreceptor afferents in chronic muscle pain in the rat masseter muscle. *PLoS One*. 2010;5(6).
16. Pang YW, Li J, Nakamura K, Wu S, Kaneko T, Mizuno N. Expression of vesicular glutamate transporter 1 immunoreactivity in peripheral and central endings of trigeminal mesencephalic nucleus neurons in the rat. *J Comp Neurol*. 2006;498(1):129-41.
17. Cervero F. Pain: friend or foe? A Neurobiologic perspective: the 2008 Bonica Award Lecture. *Reg Anesth Pain Med*. 2009;34(6):569-74.



18. Cesaro P, Keravel Y, Ollat H, Peschanski M, Sindou M. Le cerveau La moelle épinière: ANPP ([Paris]); 1994.
19. Beaulieu P, editor. Pharmacologie de la douleur. Montréal: Les presses de l'Université de Montréal; 2005.
20. Tracey I. Imaging pain. Br J Anaesth. 2008;101(1):32-9.
21. Albanese MC, Duerden EG, Rainville P, Duncan GH. Memory traces of pain in human cortex. J Neurosci. 2007;27(17):4612-20.
22. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. Neuron. 2006;52(1):77-92.
23. Sluka KA, Price MP, Breese NM, Stucky CL, Wemmie JA, Welsh MJ. Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. Pain. 2003;106(3):229-39.
24. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain. 1990;43(2):205-18.
25. Ogawa A, Morimoto T, Hu JW, Tsuboi Y, Tashiro A, Noguchi K, et al. Hard-food mastication suppresses complete

Freund's adjuvant-induced nociception. *Neuroscience*. 2003;120(4):1081-92.

26. Li D, Yang H, Meyerson BA, Linderorth B. Response to spinal cord stimulation in variants of the spared nerve injury pain model. *Neurosci Lett*. 2006;400(1-2):115-20.

27. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992;50(3):355-63.

28. Kerins CA, Carlson DS, McIntosh JE, Bellinger LL. Meal pattern changes associated with temporomandibular joint inflammation/pain in rats; analgesic effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;75(1):181-9.

29. Imbe H, Iwata K, Zhou Q, Zou S, Dubner R, Ren K. Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation and trigeminal neuronal activation. Implications for persistent temporomandibular pain. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(3):238-47.

30. Gameiro GH, Gameiro PH, Andrade AS, Pereira LF, Arthuri MT, Marcondes FK, et al. Nociception- and anxiety-like behavior in

rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiol Behav.* 2006;87(4):643-9.

31. Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* 2000;87(2):149-58.

32. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* 1988;33(1):87-107.

33. Ren K, Dubner R. Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia. *Ilar J.* 1999;40(3):111-8.

34. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nature neurosciences supplement.* 2002;5(november):1062-7.

35. Le Bars D, Adam F. Nocicepteurs et médiateurs dans la douleur aiguë inflammatoire Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation.* 2002;21(4):315-35.

36. Peng H, Lewandrowski U, Muller B, Sickmann A, Walz G, Wegierski T. Identification of a Protein Kinase C-dependent phosphorylation site involved in sensitization of TRPV4 channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(4):1721-5.

37. Ro JY, Nies M, Zhang Y. The role of peripheral N-methyl-D-aspartate receptors in muscle hyperalgesia. *Neuroreport*. 2005;16(5):485-9.
38. Imbe H, Dubner R, Ren K. Masseteric inflammation-induced Fos protein expression in the trigeminal interpolaris/caudalis transition zone: contribution of somatosensory-vagal-adrenal integration. *Brain Res*. 1999;845(2):165-75.
39. Kehl LJ, Trempe TM, Hargreaves KM. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. *Pain*. 2000;85(3):333-43.
40. Mogil JS, Breese NM, Witty M, Ritchie J, Rainville M, Ase A, et al. Transgenic expression of a dominant-negative ASIC3 subunit leads to increased sensitivity to mechanical and inflammatory stimuli. *J Neurosci*. 2005;25(43):9893-901.
41. Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav*. 1999;67(5):711-6.
42. Kobayashi Y, Sekiguchi M, Konno S, Kikuchi S. Increased intramuscular pressure in lumbar paraspinal muscles and low back

pain: model development and expression of substance P in the dorsal root ganglion. *Spine*. 1976;35(15):1423-8.

43. Issberner U, Reeh PW, Steen KH. Pain due to tissue acidosis: a mechanism for inflammatory and ischemic myalgia? *Neurosci Lett*. 1996;208(3):191-4.

44. Pan JW, Hamm JR, Rothman DL, Shulman RG. Intracellular pH in human skeletal muscle by <sup>1</sup>H NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(21):7836-9.

45. Hood VI, Schubert C, Keller U, Muller S. Effect of systemic pH on pHi and lactic acid generation in exhaustive forearm exercise. *Am J Physiol*. 1988;255(3 Pt 2):F479-85.

46. Stohler CS, Lund JP. Psychophysical and orofacial motor response to muscle pain: validation and utility of an experimental model. . In: Morimoto T, Matsuya T, Takada K (Eds) *Brain and Oral Functions*. 1995.

47. Kellgren JH. Observations on referred pain arising from muscle. 1938;3:175–90.

48. Feinstein B, Langton JN, Jameson RM, Schiller F. Experiments on pain referred from deep somatic tissues. *J Bone Joint Surg Am.* 1954;981-97.
49. Ashton-Miller JA, McGlashen KM, Herzenberg JE, Stohler CS. Cervical muscle myoelectric response to acute experimental sternocleidomastoid pain. *Spine.* 1976;15(10):1006-12.
50. Zhang X, Ashton-Miller JA, Stohler CS. A closed-loop system for maintaining constant experimental muscle pain in man. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1993;40(4):344-52.
51. Svensson P. What can human experimental pain models teach us about clinical TMD? *Arch Oral Biol.* 2007;52(4):391-4.
52. Stohler CS, Lund JP. Effects of noxious stimulation of the jaw muscles on the sensory experience of volunteer human subjects. In Stohler CS, Carlson DS 7722 (eds), *Biological and psychological aspects of orofacial pain* Ann Arbor. 1994:55-73.
53. Stohler CS, Kowalski CJ, Lund JP. Muscle pain inhibits cutaneous touch perception. *Pain.* 2001;92(3):327-33.

54. Stohler CS, Kowalski CJ. Spatial and temporal summation of sensory and affective dimensions of deep somatic pain. *Pain*. 1999;79(2-3):165-73.
55. Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L, Svensson P, Jensen TS. Quantification of local and referred muscle pain in humans after sequential i.m. injections of hypertonic saline. *Pain*. 1997;69(1-2):111-7.
56. Kato Y, Kowalski CJ, Stohler CS. Habituation of the early pain-specific respiratory response in sustained pain. *Pain*. 2001;91(1-2):57-63.
57. Ro JY, Capra NF, Lee J, Masri R, Chun Y. Hypertonic saline-induced muscle nociception and c-fos activation are partially mediated by peripheral NMDA receptors. *Eur J Pain*. 2007;11(4):398-405.
58. Miles MP, Clarkson PM. Exercise-induced muscle pain, soreness, and cramps. *J Sports Med Phys Fitness*. 1994;34(3):203-16.
59. Hamamoto DT, Ortiz-Gonzalez XR, Honda JM, Kajander KC. - Intraplantar injection of hyaluronic acid at low pH into the rat

hindpaw produces tissue acidosis and enhances withdrawal responses to mechanical stimuli. *Pain*. 1998;74(2-3):225-34.

60. Steen KH, Reeh PW. Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett*. 1993;154(1-2):113-6.

61. Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci*. 1992;12(1):86-95.

62. Reeh PW, Steen KH. Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog Brain Res*. 1996;113:143-51.

63. Skyba DA, King EW, Sluka KA. Effects of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptor antagonists on the development and maintenance of hyperalgesia induced by repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain*. 2002;98(1-2):69-78.

64. Nielsen AN, Mathiesen C, Blackburn-Munro G. Pharmacological characterisation of acid-induced muscle allodynia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;487(1-3):93-103.



65. Kim SH, Song J, Mun H, Park KU. Effect of the combined use of tramadol and milnacipran on pain threshold in an animal model of fibromyalgia. *Korean J Intern Med.* 2009;24(2):139-42.
66. Da Silva LF, Desantana JM, Sluka KA. Activation of NMDA receptors in the brainstem, rostral ventromedial medulla, and nucleus reticularis gigantocellularis mediates mechanical hyperalgesia produced by repeated intramuscular injections of acidic saline in rats. *J Pain.* 2010;11(4):378-87.
67. Bement MK, Sluka KA. Co-localization of p-CREB and p-NR1 in spinothalamic neurons in a chronic muscle pain model. *Neurosci Lett.* 2007;418(1):22-7.
68. Sukriti, Hota D, Pandhi P. Potentiation of antihyperalgesic activity of diclofenac by nimodipine in a formalin model of facial pain in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2004;26(4):253-6.
69. Shinoda M, Ozaki N, Asai H, Nagamine K, Sugiura Y. Changes in P2X3 receptor expression in the trigeminal ganglion following monoarthritis of the temporomandibular joint in rats. *Pain.* 2005;116(1-2):42-51.

70. Pattipati SN, Kinsey SG, Guo T, Cravatt BF, Lichtman AH. Regulation of Inflammatory Pain by Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH). *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;7:7.
71. Eriksson J, Jablonski A, Persson AK, Hao JX, Kouya PF, Wiesenfeld-Hallin Z, et al. Behavioral changes and trigeminal ganglion sodium channel regulation in an orofacial neuropathic pain model. *Pain*. 2005;119(1-3):82-94.
72. Chichorro JG, Zampronio AR, Rae GA. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. *Exp Biol Med*. 2006;231(6):1136-40.
73. Ambalavanar R, Moutanni A, Dessem D. Inflammation of craniofacial muscle induces widespread mechanical allodynia. *Neurosci Lett*. 2006;399(3):249-54.
74. Ahn DK, Kim KH, Jung CY, Choi HS, Lim EJ, Youn DH, ., et al. Role of peripheral group I and II metabotropic glutamate receptors in IL-1 $\beta$ -induced mechanical allodynia in the orofacial area of conscious rats. *Pain*. 2005;118(1-2):53-60.
75. Hogan Q. Animal Pain Model. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. [Article dans le cours de pharmacologie de la douleur.

21 janvier 2009. Prof Hélène Héon.]. 2002;27(4 (July-August)):385-441.

76. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1957;111(4):409-19.

77. Taiwo YO,Coderre TJ, Levine JD. The contribution of training to sensitivity in the nociceptive paw-withdrawal test. Brain Res. 1989;487(1):148-51.

78. Ambalavanar R, Moritani M, Moutanni A, Gangula P, Yallampalli C, Dessem D. Deep tissue inflammation upregulates neuropeptides and evokes nociceptive behaviors which are modulated by a neuropeptide antagonist. Pain. 2006;120(1-2):53-68.

79. Yokoyama T, Maeda Y, Audette KM, Sluka KA, . Pregabalin reduces muscle and cutaneous hyperalgesia in two models of chronic muscle pain in rats. J Pain. 2007;8(5):422-9.

80. Skyba DA, Radhakrishnan R, Sluka KA. Characterization of a method for measuring primary hyperalgesia of deep somatic tissue. J Pain. 2005;6(1):41-7.

81. Mathews KA. Pain assessment and general approach to management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2000;30(4):729-55.
82. Meunier A, Braz J, Cesselin F, Hamon M, Pohl M. Inflammation et douleur : thérapie génique expérimentale. *MEDECINE/SCIENCES.* 2004;20:325-30.
83. Gilron I, Watson C, Peter N, Cahill CM, Moulin DE. Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *Cmaj.* 2006;175(3):265-75.
84. Abbadie C, Bhangoo S, De Koninck Y, Malcangio M, Melik-Parsadaniantz S, White FA. Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res Rev.* 2009;60(1):125-34.
85. Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract.* 2010;10(3):167-84.
86. Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):7723-30.

87. Costigan M, Belfer I, Griffin RS, ., Dai F, Barrett LB, Coppola G, et al. Multiple chronic pain states are associated with a common amino acid-changing allele in KCNS1. *Brain*. 2010;133(9):2519-27.
88. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, et al. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet*. 2005;14(1):135-43.
89. Tremblay J, Hamet P. Genetics of pain, opioids, and opioid responsiveness. *Metabolism*. 2010;59(1):S5-8.
90. Fields HL, editor. *Pain*. New York: McGraw-Hill Book Company.; 1987.
91. Woof CJ. Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain*. [Editorial]. 1996;66:105-8.
92. Sheen K, Chung JM. Signs of neuropathic pain depend on signals from injured nerve fibers in a rat model. *Brain Res*. 1993;610(1):62-8.

93. Gracely RH, Lynch SA, Bennett GJ. Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain*. 1992;51(2):175-94.
94. Amir R, Michaelis M, Devor M. Membrane potential oscillations in dorsal root ganglion neurons: role in normal electrogenesis and neuropathic pain. *J Neurosci*. 1999;19(19):8589-96.
95. Pedroarena CM, Pose IE, Yamuy J, Chase MH, Morales FR. Oscillatory membrane potential activity in the soma of a primary afferent neuron. *J Neurophysiol*. 1999;82(3):1465-76.
96. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000;288(5472):1765-9.
97. Weerakkody NS, Percival P, Hickey MW, Morgan DL, Gregory JE, Canny BJ, et al. Effects of local pressure and vibration on muscle pain from eccentric exercise and hypertonic saline. *Pain*. 2003;105(3):425-35.
98. Weerakkody NS, Whitehead NP, Canny BJ, Gregory JE, Proske U. Large-fiber mechanoreceptors contribute to muscle soreness after eccentric exercise. *J Pain*. 2001;2(4):209-19.

99. Amir R, Kocsis JD, Devor M. Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *J Neurosci.* 2005;25(10):2576-85.
100. Wall PD, Devor M. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain.* 1983;17(4):321-39.
101. Newham DJ, Mills KR, Quigley BM, Edwards RH. Pain and fatigue after concentric and eccentric muscle contractions. *Clin Sci.* 1983;64(1):55-62.
102. Muthalib M, Lee H, Millet GY, Ferrari M, Nosaka K. Comparison between maximal lengthening and shortening contractions for biceps brachii muscle oxygenation and hemodynamics. *J Appl Physiol.* 2010;1:1.
103. Turp JC, Kowalski CJ, Stohler CS. Temporomandibular disorders--pain outside the head and face is rarely acknowledged in the chief complaint. *J Prosthet Dent.* 1997;78(6):592-5.
104. Turp JC, Kowalski CJ, O'Leary N, Stohler CS. Pain maps from facial pain patients indicate a broad pain geography. *J Dent Res.* 1998;77(6):1465-72.

105. Benoliel R, Sharav Y. Chronic orofacial pain. *Curr Pain Headache Rep.* 2010;14(1):33-40.
106. Stohler CS. Taking stock: from chasing occlusal contacts to vulnerability alleles. *Orthod Craniofac Res.* 2004;7(3):157-61.
107. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990;33(2):160-72.
108. Cuatrecasas G, Gonzalez MJ, Alegre C, Sesmilo G, Fernandez-Sola J, Casanueva FF, et al. High Prevalence of Growth Hormone Deficiency in Severe Fibromyalgia Syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;14:14.
109. The-National-Fibromyalgia-Association. 2010; Available from: <http://www.fmaware.org>.
110. Valdes M, Collado A, Bargallo N, Vazquez M, Rami L, Gomez E, et al. Increased glutamate-glutamine compounds (Glx) in the brain of patients with fibromyalgia: A MR spectroscopy study. *Arthritis Rheum.* 2010;26:26.



111. Lee JS, Ro JY. Peripheral metabotropic glutamate receptor 5 mediates mechanical hypersensitivity in craniofacial muscle via protein kinase C dependent mechanisms. *Neuroscience*. 2007;146(1):375-83.
112. Bewick GS, Reid B, Richardson C, Banks RW. Autogenic modulation of mechanoreceptor excitability by glutamate release from synaptic-like vesicles: evidence from the rat muscle spindle primary sensory ending. *J Physiol*. 2005;562(Pt 2):381-94.
113. Schaible HG. Spinal mechanisms contributing to joint pain. *Novartis Found Symp*. 2004;260:4-22.
114. Alfredson H, Lorentzon R. Chronic tendon pain: no signs of chemical inflammation but high concentrations of the neurotransmitter glutamate. Implications for treatment? *Curr Drug Targets*. 2002;3(1):43-54.
115. Wang K, Svensson P, Sessle BJ, Cairns BE, Arendt-Nielsen L. Interactions of glutamate and capsaicin-evoked muscle pain on jaw motor functions of men. *Clin Neurophysiol*. 2010;121(6):950-6.
116. Cairns BE, Gambarota G, Dunning PS, Mulkern RV, Berde CB. Activation of peripheral excitatory amino acid receptors

decreases the duration of local anesthesia. *Anesthesiology*. 2003;98(2):521-9.

117. Graven-Nielsen T, Aspegren KS, Henriksson KG, Bengtsson M, Sorensen J, Johnson A, et al. Ketamine reduces muscle pain, temporal summation, and referred pain in fibromyalgia patients. *Pain*. 2000;85(3):483-91.

118. Staud R, Vierck CJ, Robinson ME, Price DD. Effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dextromethorphan on temporal summation of pain are similar in fibromyalgia patients and normal control subjects. *J Pain*. 2005;6(5):323-32.

119. Pogatzki EM, Niemeier JS, Sorkin LS, Brennan TJ. Spinal glutamate receptor antagonists differentiate primary and secondary mechanical hyperalgesia caused by incision. *Pain*. 2003;105(1-2):97-107.

120. Miranda A, ., Peles S, Rudolph C, Shaker R, Sengupta JN. - Altered visceral sensation in response to somatic pain in the rat. *Gastroenterology*. 2004;126(4):1082-9.

121. Rosendal L, Larsson B, Kristiansen J, Peolsson M, Sogaard K, Kjaer M, et al. Increase in muscle nociceptive substances and

anaerobic metabolism in patients with trapezius myalgia: microdialysis in rest and during exercise. *Pain*. 2004;112(3):324-34.

122. Ashina M, Jorgensen M, Stallknecht B, Mork H, Bendtsen L, Pedersen JF, et al. No release of interstitial glutamate in experimental human model of muscle pain. *Eur J Pain*. 2005;9(3):337-43.

123. Lam DK, Sessle BJ, Cairns BE, Hu JW. Neural mechanisms of temporomandibular joint and masticatory muscle pain: a possible role for peripheral glutamate receptor mechanisms. *Pain Res Manag*. 2005;10(3):145-52.

124. Lam DK, Sessle BJ, Cairns BE, Hu JW. Peripheral NMDA receptor modulation of jaw muscle electromyographic activity induced by capsaicin injection into the temporomandibular joint of rats. *Brain Res*. 2005;7:1-2.

125. Cairns BE, Svensson P, Wang K, Castrillon E, Hupfeld S, Sessle BJ, et al. Ketamine attenuates glutamate-induced mechanical sensitization of the masseter muscle in human males. *Exp Brain Res*. 2006;169(4):467-72.

126. Wu SX, Koshimizu Yoshinori, Feng Yu-Peng, Okamoto Keiko, Fujiyama Fumino, Hioki Hiroyuki, et al. Vesicular glutamate transporter immunoreactivity in the central and peripheral endings of muscle-spindle afferents. *Brain Res.* 2004;18(2):247-51.
127. Todd AJ, Hughes DI, Polga RE, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, et al. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci.* 2003;17(1):13-27.
128. Lee HJ, Choi HS, Ju JS, Bae YC, Kim SK, Yoon YW, et al. - Peripheral mGluR5 antagonist attenuated craniofacial muscle pain and inflammation but not mGluR1 antagonist in lightly anesthetized rats. *Brain Res Bull.* 2006;70(4-6):378-85.
129. Steen AE, Reeh PW, Geisslinger G, Steen KH. Plasma levels after peroral and topical ibuprofen and effects upon low pH-induced cutaneous and muscle pain. *Eur J Pain.* 2000;4(2):195-209.
130. Frey LA, Sluka KA, McMullen T, Lee J, Arendt-Nielsen L, Graven-Nielsen T. Acidic buffer induced muscle pain evokes

referred pain and mechanical hyperalgesia in humans. *Pain*. 2008;140(2):254-64.

131. Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H, et al. Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain. *Mol Biol Cell*. 2010;21(15):2568-77.

132. Bevan S, Geppetti P. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends Neurosci*. 1994;17(12):509-12.

133. Connor M, Naves LA, McCleskey EW. Contrasting phenotypes of putative proprioceptive and nociceptive trigeminal neurons innervating jaw muscle in rat. *Mol Pain*. 2005;1:31.

134. Woolf CJ. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2010;18:18.

135. Woolf CJ. Central sensitization: uncovering the relation between pain and plasticity. *Anesthesiology*. 2007;106(4):864-7.

136. DeSantana JM, Sluka KA. Central mechanisms in the maintenance of chronic widespread noninflammatory muscle pain. *Curr Pain Headache Rep.* 2008;12(5):338-43.
137. Luo P, Wong R, Dessem D. Projection of jaw-muscle spindle afferents to the caudal brainstem in rats demonstrated using intracellular biotinamide. *J Comp Neurol.* 1995;358(1):63-78.
138. Ambalavanar R, Yallampalli C, Yallampalli U, Dessem D. Injection of adjuvant but not acidic saline into craniofacial muscle evokes nociceptive behaviors and neuropeptide expression. *Neuroscience.* 2007;149(3):650-9.

